

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

**Ana Filipa Macedo Magalhães Martins**

---

**Prevalência de resistência a antimicrobianos  
em isolados ambientais de *Escherichia coli* e  
enterococos**

Mestrado em

Tecnologia Bioquímica em Saúde

Dezembro de 2012



ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA  
SAÚDE DO PORTO  
INSTITUTO POLITÉCNICO DO PORTO

---

Ana Filipa Macedo Magalhães Martins

---

**Prevalência de resistência a  
antimicrobianos em isolados  
ambientais de *Escherichia coli* e  
enterococos**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Rúben Fernandes (Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto do Instituto Politécnico do Porto) e pelo Professor Doutor Paulo Martins da Costa (Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto).

D e z e m b r o , 2 0 1 2

**Aos meus pais,**  
sem o seu apoio, nada era possível.

## Agradecimentos

Aos meus pais,  
*pelo esforço contínuo para me proporcionarem uma vida melhor  
e pelo seu apoio nesta etapa;*

Ao Professor Doutor Paulo Martins da Costa,  
*por me receber no laboratório de Tecnologia Alimentar do ICBAS,  
pela sua dedicação, interesse e conhecimentos partilhados.*

*Obrigada Professor Doutor Rúben Fernandes  
pela dedicação e preocupação constante para que tudo pelo melhor.*

Obrigada.

## **Resumo**

A água é um recurso escasso e indispensável à vida, podendo ser um importante veículo de microrganismos patogênicos com origem fecal. A matéria fecal é também uma fonte de microrganismos resistentes a antimicrobianos e contribui para a sua disseminação e dos seus genes de resistência no ambiente e entre as comunidades microbianas comensais e microrganismos patogênicos humanos e animais. A qualidade microbiológica da água é monitorizada recorrendo à utilização de bioindicadores como *Escherichia coli*, enterococos e microrganismos totais.

O presente estudo apresentou como principal objetivo determinar a prevalência de ESBLs e AmpCs e ainda avaliar a prevalência de estirpes de enterococos com resistência à vancomicina (VRE) em águas do rio Douro e da orla costeira da cidade do Porto.

As amostragens de água foram realizadas em quatro locais localizados no estuário do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto entre o mês de Abril e Julho. A deteção e quantificação dos bioindicadores foram realizadas pelo método de filtração por membrana. A suscetibilidade das estirpes de *E. coli* e enterococos foi testada pelo método de difusão em disco relativamente a várias classes de antimicrobianos.

As contagens microbianas mais elevadas foram determinadas entre Abril e Junho e em amostras de água doce. Foram isoladas 62 estirpes de *E. coli* e 49 estirpes de enterococos que apresentaram prevalências de resistência a antimicrobianos de 90,3% (56/62) e 83,7% (41/49), respetivamente. As estirpes de *E. coli* apresentaram altas frequências de resistência à ampicilina (74,2%) e tetraciclina (61,3%). Nestas estirpes verificou-se ainda fenótipos associados a multirresistência a um mínimo de três classes de antimicrobianos em 56,5% (35/62) dos isolados. Verificou-se que as estirpes de enterococos apresentaram altos níveis de resistência à rifampicina (34,7%) e azitromicina (40,8%), detetando-se ainda a manifestação de fenótipo de resistência à vancomicina em 26,5% das estirpes. Observou-se uma prevalência de 36,7% (18/49) de estirpes de enterococos associadas a fenómenos de multirresistência antimicrobiana.

Os resultados obtidos sugerem que o rio Douro e orla costeira, bem como os ambientes aquáticos, constituem reservatórios de bactérias e genes de resistência a antimicrobianos e possuem um papel preponderante na sua disseminação.

**Palavras – chave:** Bioindicadores contaminação fecal, Resistência antimicrobiana, Ambiente, Beta-lactamases espectro alargado, enterococos resistentes à vancomicina.

## **Abstract**

Water is a scarce resource and essential to life that can be an important vehicle of pathogenic enteric bacteria. Fecal matter is also a source of antimicrobial resistant bacteria and contributes to its spread and their resistance genes into the environment and among commensal communities and human and animal pathogenic bacteria. The microbiological quality of water is monitored by the use of fecal indicator bacteria such as *Escherichia coli*, enterococci and total microorganisms.

The main objective of this study has to determine the prevalence of ESBLs and AmpC in environmental isolates of *E. coli* and also evaluate the prevalence of vancomycin-resistant enterococci strains (VRE) from Douro river estuary and coastline of Oporto city.

In the present study water samples were collected at four sites located in the Douro river estuary and coastline between April and July. The detection and quantification of biomarkers was performed by the filter membrane method. The susceptibility of strains of *E. coli* and enterococci was tested by the disk diffusion method to various classes of antimicrobials.

The higher microbial counts were determined between April and June in freshwater samples. There were isolated 62 *E. coli* strains and 49 enterococci strains that showed 90,3% (56/62) and 83,7% (41/49) antimicrobial resistance, respectively. *E. coli* strains showed higher frequencies of resistance to ampicillin (74,2%) and tetracycline (61,3%). In these strains it was found phenotypes associated with multiple antimicrobial resistance to at least three classes of antimicrobial agents in 56,5% (35/62) of the isolates. It has been found that enterococci strains showed high resistance levels to rifampicin (34,0%) and azithromycin (40,8%), and was detected the expression of vancomycin resistance phenotype in 26,5% of the strains. We found a prevalence of 36,7% (18/49) of enterococci strains associated with multidrug resistance phenomens.

The results suggest that the Douro river and aquatic environments, constitute reservoirs of resistant bacteria and genes and have a leading role in their dissemination.

**Keywords:** Fecal indicator bacteria, Antimicrobial resistance, Environment, Extended-spectrum beta-lactamases, Vancomycin-resistant enterococci.

## Índice geral

### Capítulo I

<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Agentes antimicrobianos</b>	<b>4</b>
1.1.1. Antimicrobianos que atuam por inibição da síntese da parede celular bacteriana	5
1.1.2. Biossíntese do peptidoglicano	5
1.1.3. Antimicrobianos beta-lactâmicos	6
1.1.4. Antimicrobianos glicopéptidos	14
1.1.5. Outros antimicrobianos	15
<b>1.2. Resistência antimicrobiana</b>	<b>17</b>
1.2.1. Resistência natural ou intrínseca	18
1.2.2. Resistência adquirida	18
1.2.3. Elementos genéticos móveis	19
1.2.4. Mecanismos de transmissão genética	21
1.2.5. Mecanismos bioquímicos de resistência	23
<b>1.3. Beta-lactamases</b>	<b>26</b>
1.3.1. Classificação Molecular de Ambler	27
1.3.2. Classificação funcional de Bush	27
1.3.3. Beta-lactamases de espectro alargado	28
1.3.4. Beta-lactamases classe C de Ambler	31
<b>1.4. Enterococos com resistência à vancomicina</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>33</b>

## Capítulo II

<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1. Meios de cultura e Soluções</b>	<b>38</b>
2.1.1. Meios de cultura	38
2.1.2. Soluções de Antibiótico	42
2.1.3 Soluções <i>stock</i> e tampões de pH	43
<b>2.2. Área de estudo</b>	<b>45</b>
<b>2.3. Recolha de amostras de água</b>	<b>47</b>
<b>2.4. Quantificação, isolamento e identificação microbiológica</b>	<b>47</b>
2.4.1. Método de filtração por membrana	48
2.4.2. Quantificação das estirpes bacterianas	49
2.4.3 Identificação das estirpes bacterianas	51
2.4.4. Medição dos valores de pH	52
<b>2.5. Testes de suscetibilidade antimicrobiana – Método de difusão em disco (<i>Kirby-Bauer</i>)</b>	<b>53</b>
2.5.1. Índice de multirresistência antimicrobiana (MDR)	53
<b>2.6. Transconjugações</b>	<b>54</b>
<b>2.7. Biologia Molecular</b>	<b>54</b>
2.7.1. Extração DNA total de <i>E.coli</i>	54
2.7.2. Determinação da concentração e pureza de DNA por espectrofotometria	55

## Capítulo III

<b>3. Resultados</b> .....	59
<b>3.1. Incidência de estirpes bacterianas em amostras de água do rio Douro e orla costeira</b>	<b>59</b>
3.1.1. Valores médios de bioindicadores de contaminação fecal em cada ponto de amostragem	59
3.1.2. Variação dos valores de bioindicadores de contaminação fecal ao longo do período de amostragem	62
3.1.3. Parâmetros físico-químicos (pH) e relação com valores de estirpes bacterianas	69
<b>3.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de <i>E. coli</i> e enterococos aos agentes antimicrobianos</b>	<b>75</b>
3.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de <i>E.coli</i>	76
3.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de enterococos	77
3.2.3. Fenótipos associados a multirresistência a antimicrobianos	78

## Capítulo IV

<b>4. Discussão</b> .....	85
<b>4.1. Incidência de estirpes bacterianas em amostras de água do rio Douro e orla costeira</b>	<b>85</b>
<b>4.2. Perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos</b>	<b>87</b>
4.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de <i>E. coli</i>	88
4.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de enterococos	92
4.2.3. Fenótipos associados a multirresistência a antimicrobianos	94
<b>Conclusão e perspectivas futuras</b> .....	<b>98</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>100</b>

## Abreviaturas

- 6-APA- Ácido 6-aminopenicilânico
- 7-ACA-Ácido 7-aminocefalosporânico
- AK-Amicacina
- AZ-Azida de sódio
- AMC-Amoxicilina/ácido clavulânico
- AME-*Aminoglycoside modifying enzymes*
- AMP-Ampicilina
- ATM-Aztreonamo
- AZM-Azitromicina
- BGBB-*Brilliant Green Bile (2%) Broth*
- CN-Gentamicina
- CAZ-Ceftazidima
- CHL-Cloranfenicol
- CIP-Ciprofloxacina
- CTX-Cefotaxima
- CLSI-*Clinical and Laboratory Standards Institute*
- D-Ala-D-alanina
- D-Glu-D-Glutâmico
- DNA-*Deoxyribonucleic acid*
- EN-Norma Europeia
- ERY-Eritromicina
- EDTA-Ácido etilenodiaminotetracético
- ESBLs-Beta-lactamases de espectro alargado
- ETAR-Estação tratamento águas residuais
- F-Nitrofurantoína
- F<sup>+</sup>-Estirpe dadora

F<sup>-</sup> -Estirpe recetora  
FOX-Cefoxitina  
HCl-Ácido clorídrico  
I-Intermédio  
ISO-*International Organization for Standardization*  
IPM-Imipenemo  
K-Kanamicina  
KF-Cefalotina  
KAA-*Kanamycin Aesculin Azide Agar*  
L-Ala-L-Alanina  
meso-DAP-Ácido meso-diamonopimélico  
mRNA-*messenger ribonucleic acid*  
MH-*Müller Hinton*  
MM-Massa molecular  
MDR-*Multidrug resistance*  
MRSA-*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*  
N-Norte  
NA-Ácido nalidixico  
NAG-N-acetilglucosamina  
NAM-Ácido – acetilmurâmico  
NaCl-Cloreto de sódio  
NaOH-Hidróxido de sódio  
O-Oeste  
OD-*Optical density*  
PBPs-*Penicillin-Binding-Proteins*  
PCA-*Plate count agar*  
QD-Quinupristina/dalfopristina  
R-Resistente  
RD-Rifampicina

RNA-*Ribonucleic acid*

S-Suscetível

SB-*Slanetz and Bartley Medium*

SDS-Dodecil sulfato de sódio

SRI-Sequências de repetição invertidas

STE-Solução Sódio-Ácido etilenodiaminotetracético

STR-Estreptomicina

SXT-Trimetoprim/sulfametoxazol

TE-Tris (hidroximetil) aminometano – Ácido etilenodiaminotetracético

TAE-Tris (hidroximetil) aminometano – Acetato – Ácido etilenodiaminotetracético

TBX-*Tryptone Bile X-glucuronide Agar*

TEC-Teicoplanina

TET-Tetraciclina

TOB-Tobramicina

TSA-*Tryptic Soy Agar*

TSB-*Tryptic Soy Broth*

TTC-Cloreto de trifeniltetrazólio

TRIS-Tris (hidroximetil) aminometano

UDP-Uridinodifosfato

UFC-Unidades formadoras de colónias

VAN-Vancomicina

VRE-*Vancomycin-resistant enterococcus*

## Índice de Quadros

<b>Quadro I-</b> Principais agentes antimicrobianos pertencentes à classe dos penamos. ....	9
<b>Quadro II-</b> Classificação das cefalosporinas de acordo com o seu espectro de atividade antimicrobiana.. .....	11
<b>Quadro III-</b> Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos.. .....	17
<b>Quadro IV-</b> Meios de cultura seletivos, diferenciais e enriquecidos com antimicrobianos utilizados para detecção de <i>E. coli</i> e enterococos e volumes de filtração da amostra de água. ....	49
<b>Quadro V-</b> Valores de pH mensurados nas amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto. ....	70
<b>Quadro VI-</b> Incidência e prevalência de estirpes de <i>E. coli</i> com resistência a agentes antimicrobianos em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto. ....	77
<b>Quadro VII-</b> Incidência e prevalência de estirpes de enterococos com resistência a agentes em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto. ....	78
<b>Quadro VIII-</b> Incidência e prevalência de estirpes de <i>E. coli</i> com fenótipos associados a multirresistência (MDR) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto. ....	79
<b>Quadro IX-</b> Índice de multirresistência em estirpes de <i>E. coli</i> aos agentes antimicrobianos (MDR). ....	79
<b>Quadro X-</b> Incidência e prevalência de estirpes de enterococos com fenótipo associado a multirresistência (MDR) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto. ....	80
<b>Quadro XI-</b> Índice de multirresistência em estirpes de enterococos aos agentes antimicrobianos (MDR). ....	80

## Índice de Ilustrações

<b>Ilustração I-</b> Estrutura química dos penamos.....	7
<b>Ilustração II-</b> Estrutura química do ácido aminopenicilânico (6-APA).....	8
<b>Ilustração III-</b> Estrutura química das cefalosporinas.....	10
<b>Ilustração IV-</b> Estruturas químicas das subclasses penemos e carbapenemos.....	12
<b>Ilustração V-</b> Estrutura química dos carbapenemos.....	13
<b>Ilustração VI-</b> Estrutura química dos monobactamos.....	13
<b>Ilustração VII-</b> Estrutura dos integrões.....	21
<b>Ilustração VIII-</b> Mecanismos de transferência genética.....	23
<b>Ilustração IX-</b> Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos beta-lactâmicos em microrganismos Gram-negativo como membros da família <i>Enterobacteriaceae</i> ....	25
<b>Ilustração X-</b> Local de ação das enzimas beta-lactamases.....	26
<b>Ilustração XI-</b> Bacia Hidrográfica e Estuário do Rio Douro..	37
<b>Ilustração XII-</b> Localização dos pontos de amostragem no estuário do rio Douro, Porto, Portugal e das estações de tratamento de águas residuais e pequenos rios..	46
<b>Ilustração XIII-</b> Localização dos pontos de amostragem na Orla costeira, Porto, Noroeste de Portugal..	47
<b>Ilustração XIV-</b> Procedimentos para identificação, enumeração, isolamento e avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos de estirpes de <i>E. coli</i> presentes em amostras de água.....	48
<b>Ilustração XV-</b> Procedimentos para identificação, enumeração e avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos de estirpes de enterococo presentes em amostras de água.....	48
<b>Ilustração XVI-</b> Membrana filtrante com colónias de <i>E. coli</i> de coloração azul/esverdeada em meio de TBX.....	50
<b>Ilustração XVII-</b> Membranas filtrantes com colónias de enterococos..	50

<b>Ilustração XVIII-</b> Colônias de enterococos.....	51
<b>Ilustração XIX-</b> Isolamento de colônias de <i>E. coli</i> em meio de TBX pela técnica do riscado com esgotamento do inóculo mediante estrias horizontais e paralelas entre si .	52
<b>Ilustração XX-</b> Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de uma estirpe de <i>E. faecium</i> (H34/100) pelo método de Kirby-Bauer.....	81
<b>Ilustração XXI-</b> Método de difusão em disco e detecção de ESBLs. Disco de amoxicilina/ácido clavulânico entre os discos de cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ). .....	90

## Índice de Gráficos

- Gráfico I-** Número médio de *E. coli* e de estirpes com fenótipo de resistência (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto... 60
- Gráfico II-** Número médio de enterococos e de estirpes VRE (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto..... 61
- Gráfico III-** Número médio de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto... 62
- Gráfico IV-** Número de *E. coli* e de estirpes com fenótipo de resistência (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Freixo) ao longo do período de amostragem..... 64
- Gráfico V-** Número de enterococos e de estirpes VRE (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Freixo) ao longo do período de amostragem. .... 65
- Gráfico VI-** Número de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Freixo) ao longo do período de amostragem..... 66
- Gráfico VII-** Número de *E. coli* e de estirpes com fenótipo de resistência (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Heliporto) ao longo do período de amostragem.... 67
- Gráfico VIII-** Número de enterococos e estirpes VRE (UFC/100mL) em amostras de água de água do rio Douro (Heliporto) ao longo do período de amostragem. .... 68
- Gráfico IX-** Número de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Heliporto) ao longo do período de amostragem... .69
- Gráfico X-** Relação entre as variáveis pH e contagens de *E. coli* no ponto de amostragem Freixo ..... 71
- Gráfico XI-** Relação entre as variáveis pH e contagens de enterococos no ponto de amostragem Freixo ..... 71
- Gráfico XII-** Relação entre as variáveis pH e contagens de microrganismos totais (22°C) no ponto de amostragem Freixo..... 72
- Gráfico XIII-** Relação entre as variáveis pH e contagens de microrganismos totais (37°C) no ponto de amostragem Freixo..... 72
- Gráfico XIV-** Relação entre as variáveis pH e contagens de *E. coli* no ponto de amostragem Heliporto. .... 73

**Gráfico XV-** Relação entre as variáveis pH e contagens de enterococos no ponto de amostragem Heliporto. .... 73

**Gráfico XVI-** Relação entre as variáveis pH e contagens de microrganismos totais (22°C) no ponto de amostragem Heliporto. .... 74

**Gráfico XVII-** Relação entre variáveis pH e contagens de microrganismos totais (37°C) no ponto de amostragem Heliporto. .... 74

**Gráfico XVIII-** Prevalência de estirpes de *E. coli* com fenótipos de suscetibilidade e de resistência em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto (n=62).  
..... 75

**Gráfico XIX-** Prevalência de estirpes de enterococos com fenótipo de suscetibilidade e de resistência em amostras de águas do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto (n=49). .... 75



# **Capítulo I**

## **Introdução geral**

## **Capítulo I**

<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Agentes antimicrobianos</b>	<b>4</b>
1.1.1. Antimicrobianos que atuam por inibição da síntese da parede celular bacteriana	5
1.1.2. Biossíntese do peptidoglicano	5
1.1.3. Antimicrobianos beta-lactâmicos	6
1.1.4. Antimicrobianos glicopéptidos	14
1.1.5. Outros antimicrobianos	15
<b>1.2. Resistência antimicrobiana</b>	<b>17</b>
1.2.1. Resistência natural ou intrínseca	18
1.2.2. Resistência adquirida	18
1.2.3. Elementos genéticos móveis	19
1.2.4. Mecanismos de transmissão genética	21
1.2.5. Mecanismos bioquímicos de resistência	23
<b>1.3. Beta-lactamases</b>	<b>26</b>
1.3.1. Classificação Molecular de Ambler	27
1.3.2. Classificação funcional de Bush	27
1.3.3. Beta-lactamases de espectro alargado	28
1.3.4. Beta-lactamases classe C de Ambler	31
<b>1.4. Enterococos com resistência à vancomicina</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>33</b>

## 1. Introdução geral

Bactérias entéricas provenientes de matéria fecal podem ser encontradas em cursos de água e são agentes potenciais de doenças veiculadas por este recurso, o que se traduz num importante problema de saúde pública a nível mundial. Na monitorização da qualidade da água recorrem-se a bioindicadores de contaminação como coliformes totais, *E. coli* e enterococos (Okeke *et al.*, 2011). O risco sanitário aumenta quando estas bactérias entéricas patogénicas apresentam fenómenos de resistência a antimicrobianos (Servais and Passerat, 2009). As principais fontes de introdução e disseminação de microrganismos resistentes e genes de resistência são efluentes de esgotos com ou sem tratamento, efluentes hospitalares e escorrências provenientes de solos agrícolas (Taylor *et al.*, 2011). O solo e ambiente aquático constituem reservatórios de genes de resistência e albergam comunidades microbianas que mediante mecanismos de transferência horizontal contribuem para a disseminação de determinantes de resistência no ambiente (Taylor *et al.*, 2011).

A antibioterapia humana é considerada um dos progressos mais importantes na medicina moderna e no combate às doenças infecciosas (Gottlieb and Nimmo, 2011). No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, em agricultura e na indústria tem como consequência concomitante o desenvolvimento de estirpes resistentes (Kümmerer, 2009a). Este fenómeno ocorre naturalmente como meio de adaptação às condições do ambiente circundante, mas pode ser intensificado devido a fontes antropogénicas. Pressões seletivas constantes e a presença de antibióticos em concentrações sub-inibitórias no ambiente são fatores importantes na aquisição e seleção de resistência (Martinez, 2009; Wright, 2010).

Os beta-lactâmicos representam a classe de antimicrobianos mais utilizada mundialmente, devido essencialmente à sua grande especificidade de alvo (Wilke *et al.*, 2005). A penicilina foi introduzida na prática clínica em 1942 (Rice, 2012) e de imediato ocorreu a emergência de estirpes de *Staphylococcus aureus* não suscetíveis a este composto. Um dos mecanismos de resistência mais importante a esta classe de antimicrobianos consiste na produção de enzimas beta-lactamases que degradam o anel beta-lactâmico com a sua consequente inativação (Bush, 2010). As beta-lactamases pertencem a uma família de enzimas muito antiga, que era encontrada raramente em

isolados ambientais. A primeira beta -lactamase foi encontrada em *E. coli* previamente à utilização da penicilina (Abraham., 1940).

As ESBLs encontram-se amplamente disseminadas e novas variantes emergem constantemente. As variantes CTX-M-14 e CTX-M-15 são as ESBLs mais prevalentes a nível mundial (Bush and Fisher, 2011).

No meio ambiente, as bactérias comensais podem constituir reservatórios de genes de resistência para microrganismos patogênicos (Messi *et al.*, 2006). *Enterococcus* spp. com resistência à vancomicina (VRE) e a outros antimicrobianos podem ser encontrados em isolados ambientais. A produção combinada de vários tipos de beta-lactamases como ESBLs e AmpC confere resistência a todos os grupos de beta-lactâmicos. Os genes *bla* podem ser codificados e mediados através de plasmídeos e integrões, juntamente com outros genes de resistência resultando em fenômenos de multirresistência e rápida disseminação à escala mundial.

A contaminação de água, solos e alimentos por microrganismos resistentes pode ser responsável pelo transporte de resistência a humanos o que se traduz num grave problema de saúde pública.

## 1.1. Agentes antimicrobianos

O termo antibiótico é abrangente a todas as moléculas de origem natural ou sintética que produzem efeitos inibitórios ou letais em bactérias, fungos e protozoários. Esta ação deve-se a interações com recetores alvo específicos e indução de respostas bioquímicas, independentemente da origem ou classe do composto (Davies and Davies, 2010). Os antimicrobianos possuem propriedades que possibilitam adicionalmente a ação contra vírus. Os agentes quimioterapêuticos são compostos químicos utilizados no tratamento de patologias tumorais, promovendo processos de morte celular (Kümmerer, 2009a).

Os primeiros antimicrobianos eram de origem natural e produzidos por microrganismos. A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928. Produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, a substância relevou as suas propriedades e poder antimicrobiano inesperadamente no decorrer das suas experiências (Fleming., 1929). A descoberta da primeira enzima com capacidade de a degradar foi identificada em 1940 (Abraham, 1940), previamente à sua introdução na prática clínica em 1942. Esta mesma enzima foi denominada AmpC anos mais tarde (Jacoby, 2009). Em meados da mesma década, o estudo de estirpes de *Streptomyces* isoladas do solo levou à descoberta de outras moléculas de baixo peso molecular inibitórias do crescimento microbiano, entre elas a estreptomicina (Waksman and Woodruff, 1942). Este microrganismo tem a capacidade de produzir mais de 25 moléculas distintas (Yim *et al.*, 2006).

No meio ambiente, estas moléculas de baixo peso molecular são produzidas em pequenas concentrações e têm um papel importante na modulação da função metabólica nas comunidades bacterianas. Estes produtos podem atuar como feromonas e têm funções importantes na regulação da expressão genética bacteriana (Yim *et al.*, 2006).

Atualmente os antimicrobianos são obtidos por síntese química ou através da modificação de moléculas de origem natural (Kümmerer, 2009a). Os antimicrobianos podem ser divididos em classes e grupos, de acordo com a sua estrutura química ou mecanismo de ação. Entre algumas das classes mais frequentemente utilizadas mundialmente estão os beta-lactâmicos e glicopéptidos. Podem ainda ser classificados com base no componente celular ou sistema afetado e mediante a sua ação bacteriostática ou bactericida (Kohanski *et al.*, 2010).

De acordo com o seu mecanismo de ação, os antimicrobianos podem ser classificados em cinco categorias: i) inibição da síntese da parede celular, atuando em fases distintas da biossíntese do peptidoglicano; ii) inibição da síntese proteica; iii) interferência na síntese de ácidos nucleicos. iv) inibição da via metabólica e v) indução de danos na membrana citoplasmática com consequente perda funcional (Fernandes *et al.*, 2012).

### 1.1.1. Antimicrobianos que atuam por inibição da síntese da parede celular bacteriana

Estes antimicrobianos exercem a sua ação nas fases de biossíntese do peptidoglicano. O peptidoglicano ou mucopéptido é um heteropolímero que consiste em cadeias lineares de glicanos de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) dispostas alternadamente e unidas mediante ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Entre as cadeias adjacentes há a formação de ligações cruzadas entre os seus aminoácidos (Schleifer and Kandler, 1972; Vollmer and Bertsche, 2008). Componente parietal responsável pela morfologia bacteriana e importante elemento na proteção mecânica. Desempenha um papel fundamental na preservação da integridade da célula, prevenindo a lise celular causada pela ocorrência de oscilações na pressão osmótica intrínseca (Ogawa *et al.*, 2011).

### 1.1.2. Biossíntese do peptidoglicano

A biossíntese do peptidoglicano decorre em três fases: a citoplasmática, membranar e parietal. Na fase citoplasmática ocorre a formação de uridinodifosfato - ácido N - acetilglucosamina (UDP-NAG) e uridinodifostato- ácido N- acetilmurâmico - pentapeptídeo (NAM- pentapeptídeo). Em *E. coli* a cadeia peptídica é constituída por cinco aminoácidos respetivamente: L-alanina (L-Ala), D - ácido glutâmico (D-Glu), ácido meso – diamonopimélico (meso- DAP) e duas moléculas de D-alanina (D-Ala). Na fase seguinte os precursores são transportados do citoplasma para a parede celular e dá-se a formação dos complexos NAG-NAM- pentapeptídeo, subunidades estruturais do peptidoglicano. Na fase parietal os complexos recém-formados formam ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) com peptidoglicano pré-formado. Finalmente, as enzimas

transpeptidases e carboxipeptases atuam em conjunto, respetivamente na formação de ligações interpeptídicas entre as cadeias adjacentes (*cross-linking*) e remoção do excesso de terminal D-Ala no final do processo (Ferreira *et al.*, 2010). Estas enzimas são também designadas por *Penicillin-Binding-Proteins* (PBPs), visto que são muito sensíveis à penicilina (Sauvage *et al.*, 2008).

### 1.1.3. Antimicrobianos beta-lactâmicos

Os beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais amplamente utilizados a nível mundial. Estima-se que estes agentes de elevada importância terapêutica representam cerca de 50-70% do total de antibióticos administrados (Kümmerer, 2009a). Estes são utilizados em grande escala na medicina humana, mas o que é mais preocupante é o seu uso intensivo na medicina veterinária e a criação de animais com fatores de crescimento, agente quimioterapêuticos e profiláticos (Lara *et al.*, 2012). Estes antimicrobianos continuam a ser os compostos de eleição devido às elevadas taxas de eficácia terapêutica. O seu alvo são exclusivamente as PBPs envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana, inexistentes nas estruturas celulares eucarióticas (Llarrull *et al.*, 2010). O que resulta em tratamentos eficazes sem manifestação de efeitos colaterais adversos, o que se traduz numa baixa toxicidade para o Homem.

#### 1.1.3.1. Classificação e estrutura

Os antimicrobianos beta-lactâmicos podem ser divididos em classes e subclasses, tendo em consideração as suas características estruturais e atividade antimicrobiana. De acordo com o CLSI, existem quatro classes de beta-lactâmicos, designadamente os penamos, cefemos, monobactamos e penemos. Esta última recentemente dividida em penemos e carbapenemos (CSLI, 2011). Quando administrados em combinação com inibidores de beta-lactamases, o seu espectro de ação vê-se aumentado.

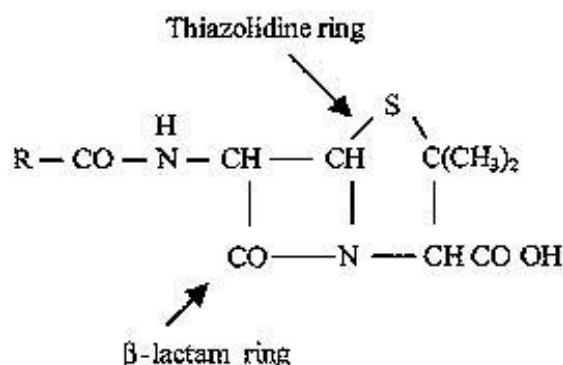
O anel beta-lactâmico é um composto cíclico altamente reativo (Babic *et al.*, 2006) derivado das azetidín-2-onas (Lara *et al.*, 2012). Esta estrutura é característica e integral de todos os grupos de beta-lactâmicos e o responsável pela sua ação antimicrobiana (Cavallo *et al.*, 2006).

Ao anel beta-lactâmico encontra-se geralmente associado um anel heterocíclico, constituído por cinco elementos (penamos e penemos) ou seis elementos (cefemos) (Dalhoff *et al.*, 2006). Os monobactamos são a única exceção, uma vez que apresentam uma estrutura monocíclica. Esta variabilidade na estrutura química tem influência nas propriedades farmacocinéticas, espectro de ação e atividade antimicrobiana de cada classe (Cavallo *et al.*, 2004).

#### 1.1.3.1.1. Penamos

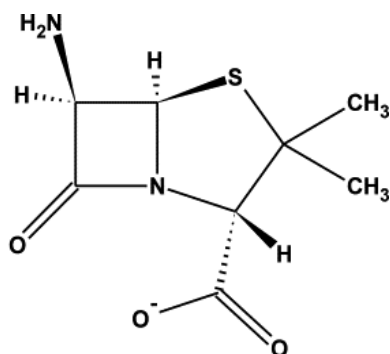
Os penamos, vulgarmente conhecidos por penicilinas, são uma classe extensa e dividida em categorias, mediante o seu espectro de atividade.

As penicilinas possuem uma estrutura bi-cíclica básica, que consiste num anel de tiazolidina (penamo) fundido ao anel beta-lactâmico e uma cadeia lateral (Lara *et al.*, 2012) (Ilustração I).



**Ilustração I-** Estrutura química dos penamos- anel beta-lactâmico fundido ao anel de tiazolidina e cadeia lateral. **Fonte:** Mendelson (1998).

Estes compostos derivam do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Ilustração II). A manipulação desta estrutura básica permitiu o desenvolvimento de inúmeros compostos com espectro de atividade distinta e maior estabilidade (Schwalbe *et al.*, 2007).



**Ilustração II-** Estrutura química do ácido aminopenicilânico (6-APA). **Fonte:** Stroganov e colaboradores (2003).

A benzilpenicilina ou penicilina G foi o primeiro beta-lactâmico introduzido na prática clínica (Babic *et al.*, 2006). A emergência de estirpes de *Staphylococcus aureus* sensíveis à penicilina (Fleming, 1946) criou a necessidade de modificação ou síntese de novos compostos mais estáveis à hidrólise. Posteriormente surgem outras moléculas como a metecilina, oxacilina e nafcilina com propriedades que as tornam resistentes às penicilinas. Em 1961, as aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina) com espectro de ação alargado aos microrganismos Gram-negativo, são eficazes entre outros contra *E. coli*. As carboxipenicilinas e ureidopenicilinas ainda com espectro de ação mais amplo contra a família das *Enterobacteriaceae* (Khardori, 2006).

A emergência de microrganismos produtores de beta-lactamases, sucessivamente com substratos mais amplos, tornou-os resistentes à maioria de antimicrobianos deste grupo, com a conseqüente limitação da sua administração clínica. Uma estratégia em resposta a esta resistência consiste na combinação de inibidores de beta-lactamases aos compostos beta-lactâmicos. Deste modo, as beta-lactamases são inibidas impedindo a hidrólise do anel beta-lactâmico e o antimicrobiano consegue alcançar o seu alvo e promover a morte celular. O ácido clavulânico, isolado a partir do *Streptomyces clavuligerus* foi o primeiro inibidor de beta-lactamases introduzido na prática clínica (Reading and Cole, 1977). O sulbactamo e tazobactamo foram sintetizados mais tarde.

Os principais agentes antimicrobianos pertencentes a esta classe de antimicrobianos beta-lactâmicos estão representados no Quadro I.

**Quadro I-** Principais agentes antimicrobianos pertencentes à classe dos penamos.

<b>Classe</b> <b>Antimicrobiano</b>	<b>Subclasse</b> <b>Antimicrobiano</b>	<b>Agentes</b> <b>Antimicrobianos</b>
<b>Penamos</b>	Penicilina	Benzilpenicilina ou Penicilina G
	Penicilinas estáveis a penicilinasases	Cloxacilina Dicloxacilina Meticilina Oxacilina
	Aminopenicilina	Amoxicilina Ampicilina
	Ureidopenicilina	Azlocilina Mezlocilina Piperacilina
	Carboxipenicilina	Carbenicilina Ticarcilina

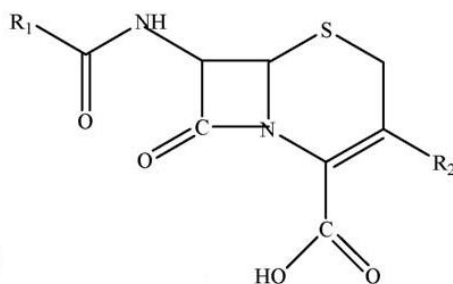
**Adaptado de** *Clinical and Laboratory International Standards* (2011).

#### 1.1.3.1.2. Cefemos

Os cefemos foram introduzidos na prática clínica nos anos 60. Estes compostos diferem estruturalmente dos penamos pela associação de um anel di-hidrotiazina ao anel beta-lactâmico.

Quimicamente podem ser classificados em cefalosporinas (Ilustração III), cefamicinas, oxa-1-cefemos, carba-1-cefemos e outros.

As cefalosporinas são caracterizadas pelo seu alargado espectro de atividade antimicrobiano, elevada taxa de eficácia clínica e baixas repercussões adversas resultantes da sua administração. Deste modo, são consideradas agentes terapêuticos de eleição na prática clínica (Singh and Arrieta, 1999).



**Ilustração III-** Estrutura química das cefalosporinas. **Fonte:** Babic e colaboradores (2006).

As propriedades líticas do fungo *Cephalosporium acremonium*, atualmente denominado *Acremonium chrysogenum*, foram descritas pela primeira vez por Giuseppe Brotzu, em 1945. A cefalosporina C foi isolada em 1953 (Newton and Abraham, 1954), sendo a sua síntese total conseguida anos mais tarde (Abraham and Newton, 1961). Estes compostos têm como estrutura base o ácido 7- aminocefalosporânico (7-ACA). Composto obtido através da remoção química da cadeia C da cefalosporina, e estrutura base para a síntese da maioria das cefalosporinas conhecidas (Adegoke and Quadri, 2012).

Microbiologicamente complexas, as cefalosporinas são divididas em cinco gerações, de acordo com o seu espectro de ação (Quadro II). Nesta classificação são considerados fatores de relevo como a estabilidade a beta-lactamases, capacidade de penetração da membrana exterior de Gram-negativo e a especificidade de alvo (Williams *et al.*, 2001).

As cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração são caracterizadas pela sua atividade ótima contra bactérias Gram-positivo, como *Staphylococcus aureus* com suscetibilidade à meticilina (Khardori, 2006). A sua ação é moderada no combate a microrganismos Gram-negativo como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Schwalbe *et al.*, 2007).

A geração seguinte, menos ativa contra *staphylococci* e *streptococci*, mas apresenta espectro de atividade alargada contra microrganismos Gram-negativo, como *Klebsiella* spp, *E. coli* e *Proteus* spp. (Khardori,2006). Os agentes cefotan e cefoxitina, incluídos no grupo das cefamicinas, devido ao seu espectro de atividade são classificados como cefalosporinas de segunda geração (Fernandes *et al.*, 2008).

As cefalosporinas de terceira geração, em comparação com as anteriores, apresentam um espectro de atividade mais reduzido contra bactérias Gram-positivo. Resultantes de uma modificação química estrutural do anel, apresentam aumento de estabilidade a

beta-lactamases (Wilson, 1998). São portanto muito eficazes contra estirpes Gram-negativo pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, especialmente em estirpes produtoras de beta-lactamases. Utilizadas no tratamento de bacteriemia, septicemia e infecções generalizadas no sistema respiratório e sistema nervoso central (Singh and Arrieta, 1999).

A quarta geração é caracterizada por um espectro de ação alargado contra Gram-positivos e aumento da estabilidade, perante hidrólise de beta-lactamases codificadas cromossomicamente ou em plasmídeo. A sua atividade é acrescida contra microrganismos Gram-negativo incluindo *P. aeruginosa* (Garau, 1998; Schwalbe *et al.*, 2007).

As cefalosporinas de quinta geração são agentes antimicrobianos emergentes no combate a *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA). Nesta estão incluídos dois agentes antimicrobianos nomeadamente o ceftaroline e o ceftobiprole (Kollef, 2009). Esta nova geração é resistente à hidrólise por beta-lactamases e inibem a PBP2a, da qual resulta o fenótipo de resistência à metilina em *Staphylococcus aureus* (Schneider and Sahl, 2010).

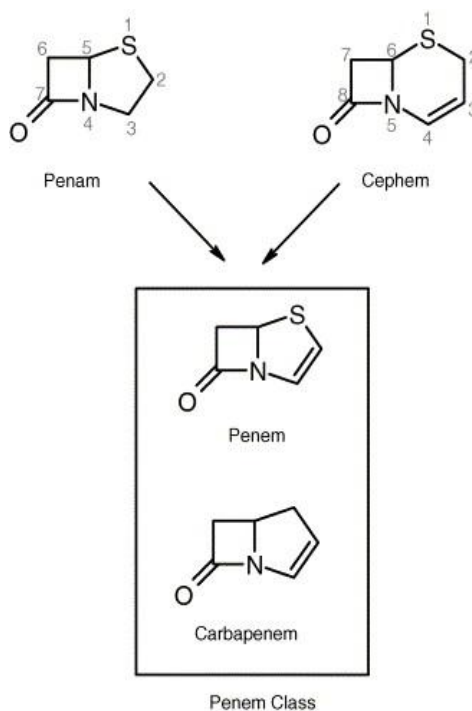
**Quadro II-** Classificação das cefalosporinas de acordo com o seu espectro de atividade antimicrobiana. **Fonte:** CLSI (2011) e Fernandes e colaboradores (2012).

Primeira geração	Segunda geração	Terceira geração	Quarta geração	Quinta geração
Cefalotina	Cefamandole	Cefotaxima	Cefepime	Ceftaroline
Cefazolina	Cefuroxima	Ceftazidima	Cefpiroma	Ceftobiprole
Cefapirina	Cefonicida	Ceftriaxona		
Cefalexina	Ceforanida	Ceftizoxima		
Cefradina	Cefaclor	Cefoperazona		
Cefadroxilo	Cefprozil	Ceftibuteno		
	Cefpodoxima	Cefixima		
	Cefoxitina	Cefatamet		
	Cefotetano			

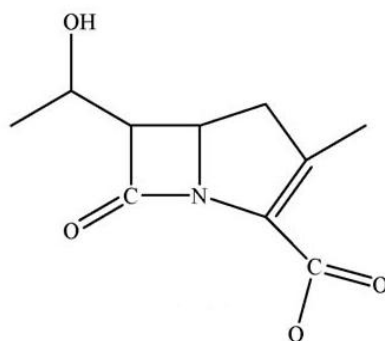
### 1.1.3.1.3. Penemos

A classe dos penemos é constituída por compostos relativamente recentes e introduzidos na clínica como antimicrobianos de último recurso no propósito de combater doenças infecciosas graves (Lara *et al.*, 2012). Esta classe é subdividida nas subclasses penemos e carbapenemos.

Derivam quimicamente dos penamos e cefemos, com algumas distinções a nível estrutural, estereoquímico e conformacional das quais resulta uma estabilidade acrescida. Similarmente aos cefemos, apresentam uma ligação dupla entre os carbonos nas posições 2 e 3, que em conjunto com o átomo de nitrogénio, constituinte do anel beta-lactâmico, aumenta significativamente a sua reatividade (Dalhoff *et al.*, 2006). Com os penamos, partilham o anel de tiazolidina, sendo característica da subclasse carbapenemos, a substituição do átomo de enxofre por um carbono (Ilustração V), constituinte que se mantém na subclasse penemos (Ilustração IV).



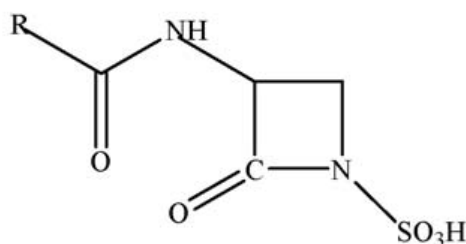
**Ilustração IV-** Estruturas químicas das subclasses penemos e carbapenemos. Esta classe que deriva dos penamos e cefemos. **Fonte:** Dalhoff e colaboradores (2006).



**Ilustração V-** Estrutura química dos carbapenemos. **Fonte:** Babic e colaboradores (2006).

#### 1.1.3.1.4. Monobactams

Os monobactams em termos de estrutura são constituídos unicamente pelo anel beta-lactâmico (Ilustração VI). É representativo desta classe o agente antimicrobiano aztreonamo.



**Ilustração VI-** Estrutura química dos monobactamos. **Fonte:** Babic e colaboradores (2006).

#### 1.1.3.2. Mecanismo de ação

A classe de antimicrobianos beta-lactâmicos atua na fase parietal da formação do peptoglicano. O anel beta-lactâmico é estericamente similar ao terminal D-Ala-D-Ala da cadeia pentapeptídica do NAM, substrato da família de enzimas D,D-transpeptidases e D,D-carboxipeptases (Schneider and Sahl, 2010). Como resultado ocorre a acilação da PBP, o que a torna incapaz de prosseguir com catalisação das reações de transpeptidação. O processo de síntese da parede celular abranda até cessar completamente.

Autolisinas endógenas, que desempenham funções fundamentais na divisão celular e biossíntese do peptidoglicano, são ativadas constitutivamente (Kohanski *et al.*, 2010). A parede celular fica estruturalmente comprometida e há um aumento da permeabilidade resultando na lise celular (Drawz and Bonomo, 2010).

Esta classe de antimicrobianos para atuar tem que se ligar obrigatoriamente ao alvo. As PBPs estão localizadas no folheto exterior da membrana citoplasmática e diferem em quantidade e tipologia. Estas podem ser divididas em duas categorias nomeadamente, alta e baixa massa molecular (MM). As de alta MM são vitais e classificadas em A ou B, de acordo com a sua função catalítica ou na morfologia bacteriana. A *E. coli* possui cinco PBPs de alta MM, três da classe A (PBP1a, PBP1b e PBP1c) e duas da classe B (PBP2 e PBP3). As PBP1a e PBP1b estão implicadas na atividade transpeptidase e transglicosilase, enquanto o papel da PBP1c é desconhecido. A PBP2 está envolvida na elongação celular e a PBP3 no processo de divisão celular. A inibição da PBP1 conduz à morte e lise celular. A inibição da PBP2 conduz a morfologia esférica e da PBP3 a morfologia filamentosa (Pratt, 2008; Sauvage *et al.*, 2008; Amador, 2010).

#### 1.1.4. Antimicrobianos glicopéptidos

A vancomicina e a teicoplanina são os principais agentes representativos desta classe. A vancomicina foi isolada pela primeira vez a partir de *Streptomyces orientalis* provenientes do solo da selva de Borneo. Este composto demonstrou de imediato possuir propriedades com elevada atividade bactericida contra *Staphylococcus* spp. Baixos graus de pureza e efeitos tóxicos prejudiciais associados conduziram à preferência de outros antimicrobianos em seu detrimento (Moellering, 2006). Na emergência de infeções decorrentes de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos como a metilina, ocorreu um aumento significativo na sua administração (Griffith, 1984).

A vancomicina é considerada um agente de última estância no combate a infeções bacterianas provocadas por bactérias Gram-positivo. O seu uso generalizado teve como consequência concomitante, a emergência de estirpes não suscetíveis entre as comunidades de *Staphylococcus* spp. e *enterococcus* spp. A emergência da primeira estirpe VRE ocorreu em 1986 na França e na Grã-Bretanha (Leclerc *et al.*, 1988; Uttley

*et al.*, 1988; Pace and Yang, 2006). A codificação em plasmídeo potencializou a sua rápida disseminação, sendo associados um ano mais tarde a infecções nos Estados Unidos da América (Pace and Yang, 2006).

#### *1.1.4.1. Mecanismo de ação*

Os glicopéptidos têm a sua ação centrada no processo de biossíntese do peptidoglicano. Distintamente aos beta-lactâmicos, estes antimicrobianos atuam na interface da fase citoplasmática e membrana. Após a formação das unidades UDP-NAG e UDP-NAM-pentapeptídeo na fase citoplasmática, estas últimas são prontamente translocadas para o transportador lipídico, não havendo a sua acumulação citoplasmática. Posteriormente dá-se o seu transporte através da membrana citoplasmática (Ferreira *et al.*, 2010).

A atividade antimicrobiana desta classe baseia-se na ligação química ao terminal dipeptídeo da cadeia peptídica (D-Ala- D-Ala) do transportador lipídico II. Esta é uma molécula altamente conservada, consistindo numa cabeça hidrofílica e cadeia de bactoprenol ligada através de uma ponte pirofosfato ao complexo NAG-NAM-pentapeptídeo (Kruijff *et al.*, 2008).

#### *1.1.5. Outros antimicrobianos*

Como referido anteriormente, para além da inibição da síntese da parede celular bacteriana existem outros mecanismos pelos quais os antimicrobianos atuam (Quadro III).

##### *1.1.5.1. Inibição da síntese proteica*

Estes antimicrobianos atuam ao nível do processo de tradução do RNA mensageiro (mRNA), compreendida em três fases: iniciação, alongação e terminação. Estes processos requerem a interação específica do mRNA, ribossomas, RNA de transferência e fatores proteicos (Videira, 2001). Os ribossomas são elementos essenciais da síntese proteica compostos por duas subunidades, que constituem alvos importantes. Os

antimicrobianos formam ligações reversíveis ou irreversíveis com estas subunidades resultando numa ação bacteriostática ou bactericida (Ferreira *et al.*, 2010). Deste modo, são inibidores da subunidade ribossomal 50S, as classes macrólidos, lincosamidas, estreptograminas (quinupristina/dalfopristina), fenícois (cloranfenicol) entre outras. As classes de antimicrobianos aminoglicosídeos e tetraciclina são inibidores da subunidade ribossomal 30S (Tenover, 2006).

#### *1.1.5.2. Interferência na síntese de ácidos nucleicos*

Os ácidos nucleicos, nomeadamente o DNA e o RNA são obtidos respetivamente pelos processos de replicação e transcrição.

As quinolonas são antimicrobianos inibidores da síntese de DNA mediando o bloqueio da DNA girase, topoisomerase II e IV com o conseqüente superenrolamento da cadeia de DNA. O complexo formado leva conseqüentemente à paragem de todo o processo, bloqueio dos garfos de replicação e impedimento da separação das cadeias de DNA. Estes antimicrobianos induzem prontamente uma ação bacteriostática e eventual morte celular (Ferreira *et al.*, 2010).

A rifampicina é um agente antimicrobiano envolvido na inibição da transcrição do RNA, apresentando elevada afinidade à subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (Kohanski *et al.*, 2010).

#### *1.1.5.3. Inibição da via metabólica*

O trimetopim é um análogo estrutural do ácido fólico. É combinado com o sulfametoxazol, uma sulfonamida com a qual atua em sinergismo. Esta combinação com ação bacteriostática inibe duas etapas fulcrais do metabolismo enzimático de formação do ácido fólico (Tenover, 2006; Ferreira *et al.*, 2010).

**Quadro III-** Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos. **Adaptado de** Tenover (2006).

<b>Mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos</b>
<b>Inibição síntese da parede celular</b> → Beta-lactâmicos → Glicopéptidos
<b>Inibição síntese proteica</b> → Subunidade ribossomal 50S: Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas (quinupristina/dalfopristina), fenicois (cloranfenicol) → Subunidade ribossomal 30S: Aminoglicosídeos e tetraciclinas
<b>Interferência da síntese de ácidos nucleicos</b> → Inibição Síntese de DNA: Quinolonas → Inibição síntese RNA: Rifampicina
<b>Inibição da via Metabólica</b> → Análogos do ácido fólico e sulfonamidas
<b>Ruptura da estrutura membrana bacteriana</b> → Polimixinas

## 1.2. Resistência antimicrobiana

Desde 1950 que a antibioterapia é aplicada no tratamento da maioria das doenças infecciosas.

Estudos demonstram evidências da existência de estirpes ambientais não patogênicas resistentes a antimicrobianos previamente à sua introdução na prática clínica. Estas moléculas de baixa MM sempre estiveram presentes no meio ambiente, como produtos de metabolismo de alguns microrganismos e desempenhando funções importantes (Davies and Davies, 2010). A transferência de resistência e seu mecanismo associado para patogênicos humanos/animais, terá ocorrido aquando da codificação dos genes de resistência em elementos genéticos móveis (Andersson and Hughes, 2012).

O desenvolvimento de resistência implica a existência de um antimicrobiano no meio com capacidade de ação inibitória da maioria dos microrganismos presentes e uma colônia heterogênea de bactérias, na qual pelo menos um indivíduo é portador do determinante genético que confere a expressão de resistência ao antimicrobiano em questão (Levy and Marshal, 2004; Alanis, 2005). As estirpes resistentes mutantes quando em competição direta com as estirpes *wild-type*, apresentam vantagens seletivas (Chait *et al.*, 2007), que vão implicar a seleção dos genes de resistência que posteriormente, podem ser transferidos a outros microrganismos.

Do uso exacerbado de várias classes de antimicrobianos seletivos e de amplo espectro de ação resultam pressões seletivas determinantes na seleção de estirpes resistentes no hospedeiro, manutenção e enriquecimento do seu patrimônio genético.

A mediação de co-seleção e mecanismos de transferência horizontal são os principais fenômenos responsáveis pela emergência de multirresistência entre os microrganismos patogênicos (Chait *et al.*, 2007). Mecanismos distintos possibilitam o desenvolvimento de resistência a todas as principais classes de antimicrobianos utilizados na antibioterapia.

A resistência a antimicrobianos advém de mecanismos que podem ser intrínsecos ou por outro lado adquiridos.

### 1.2.1. Resistência natural ou intrínseca

A resistência intrínseca ou inata manifesta-se caracteristicamente dentro de uma espécie de microrganismos. Estes não apresentam suscetibilidade a determinados compostos devido as suas características fisiológicas e bioquímicas. Este fato deve-se essencialmente à presença e produção destas moléculas no seu ecossistema natural. A sua transferência dá-se por via vertical, através de processos de divisão celular (Kümmerer, 2009b).

### 1.2.2. Resistência adquirida

Os microrganismos podem desenvolver resistência pela ocorrência de mutações genéticas espontâneas ou adaptativas. As mutações espontâneas ocorrem ao nível

cromossomal e são muito raras. Advém de erros na replicação ou da reparação incorreta de erros do DNA (Giedraitienė *et al.*, 2011). As mutações adaptativas são geradas pelo contato direto com o antimicrobiano, presente no meio em concentrações não letais ou no decorrer de algum tratamento terapêutico. Este fenômeno manifesta-se no decorrer do processo adaptativo às alterações nocivas e pressões induzidas no meio (Alanis, 2005). A aquisição de resistência por meio de mutações cromossômicas é transmitida verticalmente entre gerações.

A transferência horizontal de material genético é outro mecanismo de desenvolvimento de resistência entre microrganismos da mesma espécie ou espécies diferentes. Este consiste na aquisição e incorporação de material genético exógeno proveniente de microrganismos não suscetíveis.

### 1.2.3. Elementos genéticos móveis

Individualmente ou em coexistência, os elementos genéticos móveis desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e sua disseminação (Harada, 2012). Estes elementos podem ser classificados de acordo com a sua capacidade de mobilidade entre células bacterianas distintas e dentro da mesma célula. Os elementos com capacidade de movimentação de uma célula bacteriana para outra designam-se plasmídeos e as transposições e integrões conseguem mover-se intrinsecamente no genoma entre múltiplas localizações (Bennett, 2008).

#### 1.2.3.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos de cadeia dupla e circular, localizados no citosol bacteriano. O seu tamanho é variável, possuem capacidade auto-replicativa e não constituem moléculas essenciais, porém conferem funções adicionais importantes (Nelson and Cox, 2005). Sendo uma delas a capacidade de sobrevivência na presença de compostos potencialmente letais como antimicrobianos e metais pesados tóxicos.

Genes de resistência a quase todas as classes de antimicrobianos clinicamente importantes são frequentemente codificados em plasmídeos de resistência (Bennett, 2008). Na sua grande maioria são conjugativos, com a capacidade de promover a sua transferência e a transferência de outros plasmídeos para outras células. Este é um importante mecanismo na disseminação de resistência a antimicrobianos para células suscetíveis aos mesmos.

#### 1.2.3.2. *Transposões*

Os transposões estão incluídos no grupo de elementos móveis transposáveis e consistem em elementos móveis de DNA com capacidade de excisão e inserção em múltiplos locais dentro do genoma. Estes podem mover-se intra - molecularmente ou seja, dentro da mesma molécula de DNA ou inter-molecularmente, de uma molécula de DNA para outra, como plasmídeos.

Estruturalmente são caracterizados pela presença de extremidades, contendo sequências de repetição diretas ou invertidas (SRI). Estas sequências são flanqueadoras da seção central de DNA, que pode codificar genes de resistência a antimicrobianos, função que provoca alterações no fenótipo (Bennett, 2008).

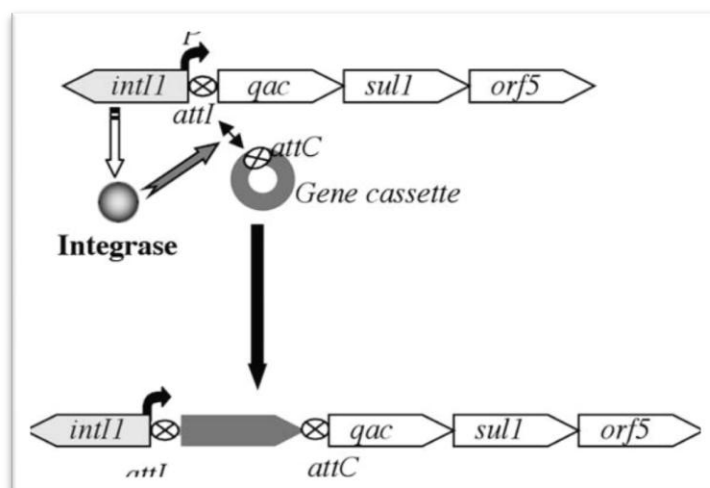
#### 1.2.3.3. *Integrões*

Os integrões são elementos de aquisição de genes identificados em 1987 (Stokes and Hall, 1989) que utilizam locais de recombinação específicos (Bennett, 2008). São classificados em quatro classes de acordo com a homologia entre as cadeias de aminoácidos da integrase (Carattoli, 2001).

Estruturalmente consistem em dois segmentos conservados 5' e 3'. São constituídos por um gene *intI* que codifica a enzima integrase pertencente à família da tirosina recombinase e um local de recombinação (*attI*), onde pode ocorrer inserção ou excisão de cassetes genéticas (Ilustração VII) (Partridge *et al.*, 2008; Di Conza and Gutkind, 2010).

Os genes são capturados por recombinação através da enzima integrase entre o local *attI* e o local *attC* localizado na cassete genética. Após a captação de genes, os locais de recombinação são reconstruídos e novas cassetes podem ser incorporadas (Martinez, 2009).

Estes elementos móveis desempenham um papel dominante no desenvolvimento de multirresistência na família das *Enterobacteriaceae* (Köseoğlu, 2004).



**Ilustração VII-** Estrutura dos integrões. *Int11*- integrase; local de recombinação (*attI*); promotor (P); *qac*- gene codificante de resistência ao amônio quaternário; *sul1*- gene codifica resistência à sulfonamida; *orf5*- gene com função desconhecida. Fonte: Martinez (2009).

#### 1.2.4. Mecanismos de transmissão genética

A conjugação, transformação e transdução constituem os principais mecanismos envolvidos na transferência de material genético entre microrganismos (Ilustração VIII).

##### 1.2.4.1. Conjugação

A conjugação é um processo unilateral de transferência de material genético entre bactérias de géneros iguais ou distintos. O fator de fertilidade constitui um elemento genético, codificado a nível do genoma bacteriano ou em plasmídeos com capacidade replicativa independente. Este elemento é mediador do processo de conjugação (Ferreira

*et al.*, 2010), que ocorre através do contato direto entre duas células, com o estabelecimento de uma ligação entre si pela formação do pili sexual (Alanis, 2005). Deste modo, dá-se a transferência de fragmentos de DNA, normalmente plasmídeos, da célula dadora (F<sup>+</sup>) para a célula recetora (F<sup>-</sup>). Os fatores de resistência são uma classe de plasmídeos não conjugativos, onde se encontram codificados genes de resistência a agentes antimicrobianos e metais pesados (Khardori, 2006). Quando mobilizados por plasmídeos conjugativos, a célula recetora adquire resistência a esses compostos e transforma-se em dadora, com a capacidade de transmissão de material genético para outras bactérias (Ferreira *et al.*, 2010).

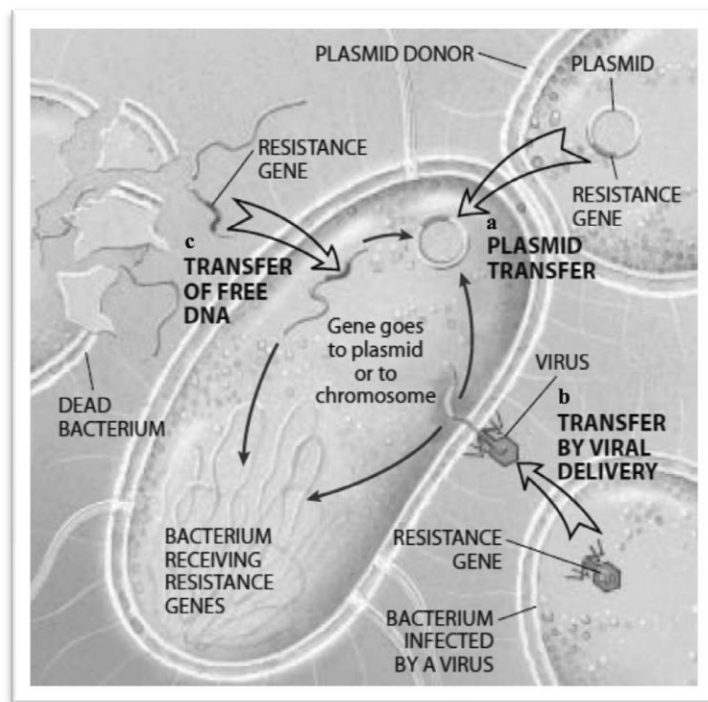
#### 1.2.4.2. Transformação

A transformação consiste num processo de captação de fragmentos de DNA exógeno e sua incorporação no genoma bacteriano. A libertação de DNA da célula dadora para o meio ambiente, advém geralmente como consequência da sua lise celular (Brown, 2002).

Este mecanismo em meio natural é considerado raro, visto que somente células recetoras num estado fisiológico de competência, são capazes de incorporar material genético exógeno (Ferreira *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.3. Transdução

O fenómeno de transdução é mediado por vetores como bacteriófagos, ou seja vírus com capacidade infecciosa sobre bactérias da mesma espécie. O vírus carrega o material genético e transfere-o aquando a infeção de um novo hospedeiro. A transferência simultânea de DNA viral induz processos de replicação constitutiva até eventual morte celular e libertação dos novos bacteriófagos infecciosos (Alanis, 2005).



**Ilustração VIII-** Mecanismos de transferência genética. A) Conjugação; B) Transdução; C) Transformação. Fonte: Levy (1998).

### 1.2.5. Mecanismos bioquímicos de resistência

A resistência a antimicrobianos, inata ou adquirida por processos de modificação do DNA pré-existente, quer por expansão do genoma através da aquisição de material genético exógeno, manifesta-se mediante vários mecanismos biológicos visando a redução ou inativação do agente antimicrobiano (Ilustração IX).

#### 1.2.5.1. Modificação do alvo

Alterações estruturais no recetor do antimicrobiano resultam frequentemente de mutações espontâneas a nível do cromossoma e seleção na presença do antimicrobiano. São responsáveis pela diminuição da afinidade entre o recetor e o antimicrobiano com a consequente redução dos seus efeitos (Lambert, 2005).

O peptidoglicano componente da parede celular bacteriana constitui um ótimo alvo seletivo dos antimicrobianos, derivado da sua ausência nas células eucarióticas. A resistência a beta-lactâmicos pode ser mediada pela alteração dos seus alvos, enzimas

envolvidas no processo de biossíntese do peptidoglicano, nomeadamente as transpeptidases. As modificações induzidas nestes recetores advêm de vários fenómenos como codificação de novas moléculas alteradas com sensibilidade diminuída, mutações em alvos endógenos com consequente redução da reatividade entre o recetor e o antimicrobiano e regulação aumentada da expressão de PBPs (Wilke *et al.*, 2005).

#### *1.2.5.2. Diminuição da permeabilidade da membrana externa*

Este mecanismo atua pela redução ou deleção da expressão de porinas, proteínas constituintes da membrana, impedindo a entrada de compostos nocivos e consequente resistência a estes compostos.

#### *1.2.5.3. Aumento do efluxo*

As bombas de efluxo são proteínas membranares que desempenham uma função determinante na redução da concentração citoplasmática de compostos tóxicos, como antimicrobianos (Wasaznik *et al.*, 2009). Estes complexos têm como componentes fundamentais: i) uma proteína localizada na membrana externa que atua como canal e se abre para libertar os compostos para o meio exterior; ii) uma proteína na membrana interna; iii) um componente periplasmático que faz a ligação entre as proteínas membranares (Pietras *et al.*, 2008).

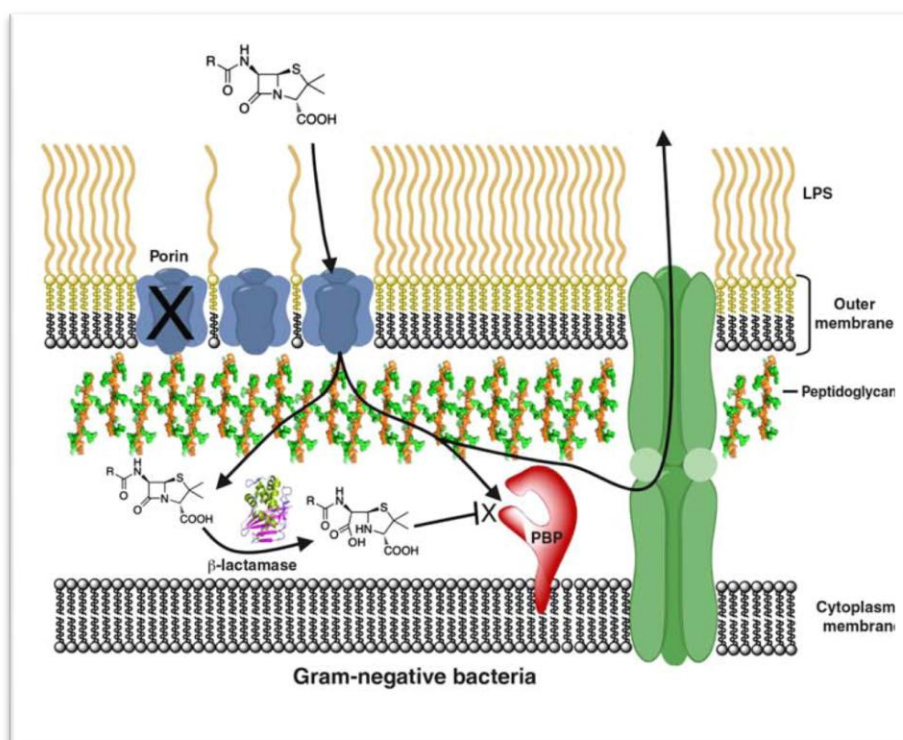
Estes sistemas são frequentes em bactérias Gram-negativo como *E. coli* e podem conferir resistência a antimicrobianos como beta-lactâmicos (Palmer, 2003). Este mecanismo de transporte promove a exportação das moléculas com capacidade de penetração na parede e membranas celulares, até concentrações abaixo do limiar de ação bacteriostático ou bactericida. Estas proteínas podem ser transportadoras de inúmeros compostos o que pressupõe desenvolvimento de multirresistência, sem a necessidade de aquisição de determinantes de resistência múltiplos e específicos a cada uma das distintas classes de antimicrobianos (Zgurskaya, 2002).

#### 1.2.5.4. Inativação ou modificação enzimática

Este mecanismo ocorre mediante a expressão de enzimas com capacidades hidrolíticas ou de modificação química dos antimicrobianos, com a sua consequente inativação antes de atingir o alvo. As principais enzimas envolvidas nesta função são as beta-lactamases, esterases e transferases (Giedraitienė *et al.*, 2011).

As beta-lactamases constituem o principal mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos nos microrganismos Gram-negativo. Os seus genes são frequentemente codificados em plasmídeos ou transposões o que potencializa a sua rápida disseminação (Wilke *et al.*, 2005).

A expressão de genes que codificam enzimas esterases é prevalente na família das *Enterobacteriaceae* e conferem resistência a aminoglicosídeos (Kim *et al.*, 2010; Giedraitienė *et al.*, 2011). As transferases medeiam a resistência a agentes antimicrobianos como aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrólidos e rifampicina. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) são identificadas em *Enterococcus faecalis* (Giedraitienė *et al.*, 2011).

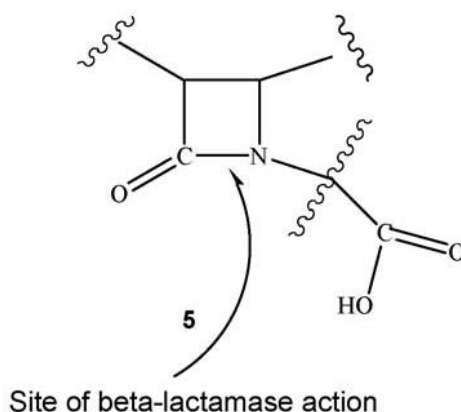


**Ilustração IX-** Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos beta-lactâmicos em microrganismos Gram-negativo como membros da família *Enterobacteriaceae*. Fonte: Llarrul e colaboradores (2010).

### 1.3. Beta-lactamases

As beta-lactamases pertencem a uma família de enzimas muito antiga. Estudos filogenéticos estabelecem que estas enzimas foram originadas há bilhões de anos e são incorporadas em plasmídeos há milhões de anos, muito antes da utilização dos antimicrobianos na clínica (Hall and Barlow, 2004; Garau *et al.*, 2005; Aminov and Mackie, 2007).

O desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos beta-lactâmicos ao longo dos anos e as pressões seletivas decorrentes do seu uso exacerbado tiveram como consequências a emergência e seleção de novas variantes de beta-lactamases (Bradford., 2001). A sua produção constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência nas bactérias Gram negativo (Frase *et al.*, 2011). O seu mecanismo hidrolítico consiste na hidrólise da ligação C-N do anel beta-lactâmico resultando na inativação do composto (Ilustração X).



**Ilustração X-** Local de ação das enzimas beta-lactamases. **Fonte:** Babic e colaboradores (2006).

Atualmente são identificadas mais de 1000 enzimas beta-lactamases com ocorrência natural, sendo as pertencentes ao grupo 2/classe A comparativamente mais abundantes. Desde 2005 foram identificados inúmeros variantes pertencentes às várias famílias de beta-lactamases. As famílias OXA, CTX-M, CMY, VIM e KPC sofreram um aumento muito significativo (Bush and Fisher, 2011).

### 1.3.1. Classificação Molecular de Ambler

A classificação de Ambler surge em 1980 e tem por base a homologia entre as sequências aminoacídicas das beta-lactamases. Atualmente estas enzimas são agrupadas em quatro classes moleculares (A,B,C e D).

Em 1980, apenas eram conhecidas quatro sequências de aminoácidos provenientes de beta-lactamases distintas. Estruturalmente semelhantes entre si foram todas agrupadas na Classe A. (Ambler, 1980).

O seu centro ativo pode ser constituído por um resíduo de serina, característico das beta-lactamases das classes moleculares A,C e D ou ião metálico zinco divalente integrante das enzimas da classe B. Esta estrutura é fundamental à sua atividade hidrolítica (Babic *et al.*, 2006).

### 1.3.2. Classificação funcional de Bush

A classificação funcional proposta inicialmente por Bush em 1989, tem por base o perfil de substrato e de inibição. Está correlacionada com a classificação molecular de Ambler. As enzimas pertencentes a cada classe molecular são divididas em grupos (1-4) e subgrupos de acordo com a capacidade de hidrólise de classes específicas de beta-lactâmicos e nas propriedades de inativação pelos inibidores de beta-lactamases ácido clavulânico, sulbactamo e tazobactamo (Bush and Jacoby., 2010).

As enzimas do grupo 1 pertencem à classe C de Ambler e caracteristicamente apresentam atividade aumentada a cefalosporinas e resistência à inibição pelo ácido clavulânico. Ativas contra cefamicinas como cefoxitina e com grande afinidade sobre monobactamos como o aztreonamo. O grupo 2 (Classe A e D de Ambler) é o grupo

mais extenso, abrange enzimas com distintos perfis de substrato (penicilinas, cefalosporinas, oxacilinas carbapenemas) e inibição variável ao ácido clavulânico. As enzimas do grupo 3 são metalo beta-lactamases da Classe B de Ambler, não hidrolisam os monobactams, mas são ativos em carbapenems, caracteristicamente não são inibidos pelo ácido clavulânico, mas por quelantes de íons. No grupo 4 foram incluídas penicilinas e oxacilinas resistentes à inibição pelo ácido clavulânico. Do ponto de vista molecular a sua caracterização incompleta não as permite inserir nas classes de Ambler.

### 1.3.3. Beta-lactamases de espectro alargado

As beta-lactamases de espectro alargado (ESBLs) constituem um grave problema de Saúde Pública, especialmente em pacientes hospitalizados em unidades de cuidados intensivos com associação a altas taxas de morbidade e mortalidade (Bradford, 2011; Paterson and Bonomo, 2005; Drawn and Bonomo, 2010). Atualmente estão descritas milhares de ESBLs que se encontram amplamente disseminadas a nível mundial devido essencialmente à codificação dos genes *bla* em plasmídeos e outros elementos genéticos móveis (Bush and Fisher, 2011).

Estas enzimas emergiram nos anos 80 com a introdução das cefalosporinas de 3ª geração como cefotaxima e ceftazidima na antibioterapia humana. O uso exacerbado destes compostos no tratamento de infeções graves provocadas por bactérias Gram negativo (Bradford, 2001) resultou no desenvolvimento de resistência particularmente, em membros da família das *Enterobacteriaceae* como *Klebsiella* spp. e *E. coli* (Knothe *et al.*, 1987; Babic *et al.*, 2006). A capacidade de expansão do espectro de atividade hidrolítica destas variantes às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração desenvolveu-se principalmente através da ocorrência de mutações pontuais (Pfeifer *et al.*, 2010).

A designação ESBL surgiu em 1987 (Jarlier *et al.*, 1988) e atualmente abrange beta-lactamases mediadas por plasmídeo pertencentes às classes moleculares de Ambler A, C e D (Livermore, 2008; Bush and Jacoby, 2010) e grupos funcionais 1e, 2be e 2de (Bush and Jacoby, 2010; Bush and Fisher, 2011). Funcionalmente estas enzimas possuem propriedades hidrolíticas contra penicilinas, cefalosporinas de baixo e alargado espectro de atividade bem como o monobactamo aztreonam (Bush and Fisher, 2011).

Manifestam suscetibilidade aos inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, tazobactamo ou sulbactamo) (Poirel *et al.*, 2012) e não demonstram atividade hidrolítica às cefamicinas (cefoxitina e cefotetan) e aos carbapenemos (Bradford, 2001).

Os carbapenemos são os antimicrobianos de eleição no tratamento de infecções causadas por estirpes Gram-negativo produtoras de ESBLs, o que subsequentemente origina pressões seletivas e seleção de carbapenemases (Bush, 2010). Estirpes produtoras de várias combinações de beta-lactamases como ESBLs e carbapenemases foram descritas em vários países (Pournaras *et al.*, 2010; Bush and Fisher, 2011).

Os genes *bla* são frequentemente codificados e transferidos em plasmídeos e integrões conjuntamente com determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, sulfonamidas e trimetoprim (Bush and Fisher, 2011; Poirel *et al.*, 2012) promovendo fenómenos de multirresistência aos antimicrobianos mais importantes na antibioterapia humana.

O aumento crescente e identificação de variantes de beta-lactamases levou ao seu agrupamento em famílias de acordo com a sua origem, sequência molecular e atividade hidrolítica. Os tipos de ESBLs mais numerosos e disseminados são o TEM, SHV, CTX-M e OXA (Bush and Fisher, 2011).

#### *1.3.3.1. TEM-like ESBLs*

As ESBLs do tipo TEM são muito numerosas e derivam das enzimas TEM-1 e TEM-2 (Poirel *et al.*, 2012). A TEM-1 foi descrita na Grécia em 1960 numa estirpe de *E. coli* isolada a partir de uma hemocultura (Bradford., 2001). A sua designação foi atribuída de acordo com o nome do paciente (Temoneira) (Jacoby, 2006). A TEM-3 foi identificada em 1989 e foi a primeira deste tipo a manifestar fenótipo de ESBL e até então já estão descritas mais de 150 variantes deste tipo (Bush and Fisher, 2011).

Estas enzimas estão inseridas na Classe A de Ambler e no grupo 2b de acordo com a classificação funcional de Bush and Jacoby (2010). O fenótipo ESBL advém de mutações pontuais nos genes *bla* TEM com conseqüente expansão do seu espectro de atividade sobre as cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração (Bradford, 2001), com atividade hidrolítica acrescida à ceftazidima em relação à cefotaxima (Poirel *et al.*, 2012).

#### 1.3.3.2. SHV-like ESBLs

As ESBLs do tipo SHV designadas com base no termo “Sulfhydryl reagent Variable” pertencem à Classe A de Ambler e grupo funcional 2b. Estas variantes derivam das enzimas SHV-1 filogeneticamente relacionadas com a TEM-1 com a qual partilham 68% de homologia (Drawn and Bonomo, 2010). Estas ESBLs com maior atividade à cefotaxima encontram-se amplamente disseminadas em especial a SHV-2, SHV-5 e SHV-12 (Poirel *et al.*, 2012).

#### 1.3.3.3. CTX-M-like ESBLs

As ESBLs do tipo CTX-M emergiram na década de 80 na família das *Enterobacteriaceae* e atualmente encontram-se disseminadas mundialmente (Hawley and Jones, 2009). A nomenclatura deste grupo de enzimas da Classe A de Ambler e grupo 2b de Bush advém de “Cefotaximase first isolated in Munich” (Jacoby., 2006).

Este grupo de ESBLs apresentava alto poder hidrolítico à cefotaxima, contudo já foram descritas enzimas como a CTX-M-15 com atividade hidrolítica equitativa à ceftazidima (Poirel *et al.*, 2012).

Filogeneticamente este grupo de beta-lactamases não está relacionado com as do tipo TEM e SHV, no entanto os seus genes foram identificados em microrganismos ambientais como *Kluyvera* spp. previamente à emergência destas beta-lactamases na clínica (Pitout *et al.*, 2004; Wright, 2010).

A CTX-M-14 e CTX-M-15 são as ESBLs com maior prevalência e disseminação a nível mundial (Bush and Fisher, 2011).

#### 1.3.3.4. OXA-like ESBLs

As ESBLs do tipo OXA pertencem à Classe D de Ambler e grupo funcional 2d de Bush. São caracterizadas pela alta atividade hidrolítica à oxacilina e cloxacilina e pela baixa suscetibilidade ao ácido clavulânico (Bradford, 2001; Jacoby, 2006; Bush and Jacoby, 2010).

Este tipo de ESBLs é prevalente em isolados clínicos de *P. aeruginosa* e a maioria destas variantes derivam de substituições de aminoácidos na beta-lactamase OXA-10 (Babic *et al.*, 2006; Pfeifer *et al.*, 2010).

#### 1.3.4. Beta-lactamases classe C de Ambler

As AmpC pertencem à classe C de Ambler e grupo funcional 1 de Bush e Jacoby (2010). Estas enzimas possuem atividade hidrolítica às penicilinas, cefalosporinas de espectro alargado com exceção da cefepima e cefpiroma e aos monobactamos (Jacoby, 2009; Rodríguez-Banõ *et al.*, 2012). Contrariamente às ESBLs são caracterizadas pelo poder hidrolítico às cefamicinas (cefotaxima e cefotetan) e pela não suscetibilidade à inibição pelo ácido clavulânico.

Os genes *bla* AmpC frequentemente codificados no genoma de membros da família das *Enterobacteriaceae* podem ser mobilizados em plasmídeos (Brolund *et al.*, 2010). A alta expressão de enzimas AmpC cromossômicas em *E. coli* pode ser induzida por beta-lactâmicos ou ocorrer constitutivamente como resultado de mutações no seu regulador (Jacoby, 2009; Kanamori *et al.*, 2011). A mediação dos genes *bla* AmpC em plasmídeos possibilita a expressão destas enzimas por estirpes como *Klebsiella* spp e *Salmonella* spp., onde estes genes eram inexistentes (Hanson, 2003).

A CMY-1 foi a primeira AmpC codificada em plasmídeo e atualmente juntamente com a DHA constituem os grupos de beta-lactamases AmpC mais prevalentes em *E. coli* e *K. pneumoniae* (Pfeifer *et al.*, 2010).

### 1.4. Enterococos com resistência à vancomicina

A emergência da primeira estirpe VRE ocorreu em 1986 na França e na Grã-Bretanha (Leclerc *et al.*, 1988; Uttley *et al.*, 1988; Pace and Yang, 2006) e atualmente encontram-se disseminados mundialmente. Estas estirpes são encontradas em ambiente hospitalar, na comunidade, ambiente e indústria alimentar (Messi *et al.*, 2006; Altoparlak *et al.*, 2011).

Os glicopéptidos como a vancomicina e teicoplanina reconhecem alvos no processo de biossíntese da parede celular bacteriana. A resistência de enterococos a estes antimicrobianos pode ser mediada pela alteração do seu recetor alvo, ou seja a cadeia terminal do pentapeptídeo da molécula precursora do peptoglicano (NAG-NAM-pentapeptídeo-P-P-lipídeo). A ação destes antimicrobianos sobre este precursor impede a incorporação dos complexos pelas transglicosilases na estrutura da parede celular pré formada. A codificação de enzimas que produzem precursores alterados pela substituição do terminal D-alanil-D-alanina, pelo dipeptídeo D-alanil-D-lactato, reduz a afinidade dos antimicrobianos a estes recetores (Pace and Yang, 2006; Ferreira *et al.*, 2010). As estirpes de enterococos com fenótipo VanA, VanB ou VanD apresentam resistência aos glicopéptidos através deste mecanismo de modificação do alvo. As estirpes VanA manifestam resistência adquirida à vancomicina e teicoplanina, enquanto as estirpes VanB manifestam resistência adquirida à vancomicina e suscetibilidade à teicoplanina (Messi *et al.*, 2006). As estirpes VRE com fenótipos de resistência VanC, VanE e VanG possuem resistência intrínseca a glicopéptidos em baixas concentrações devido à codificação de cadeias terminais do precursor lipídeo-II, constituídas por locais de reconhecimento D-alanina-D-serina (Wright, 2003).

## **Objetivos**

O meio ambiente aquático constitui um importante reservatório de microrganismos e genes de resistência a antimicrobianos que eventualmente podem disseminar-se através de transferência horizontal para patógenos humanos e animais.

O principal objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de ESBLs e AmpCs em isolados ambientais de *E. coli* em amostras de água provenientes do rio Douro e da orla costeira da cidade do Porto. Acresceu ainda avaliar a incidência e prevalência de estirpes VRE. No decorrer do estudo também se pretendeu: i) quantificar os bioindicadores de contaminação fecal utilizados na monitorização e avaliação da qualidade da água; ii) correlacionar as contagens de microrganismos em águas com a variável pH; iii) inferir quanto à qualidade microbiológica da água; iv) avaliar o perfil de suscetibilidade de estirpes de *E. coli* e enterococos a agentes antimicrobianos; v) evidenciar fenómenos de transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias; e vi) identificar os genes *bla* responsáveis por resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos.



# **Capítulo II**

## **Material e Métodos**

## Capítulo II

<b>2. Material e Métodos</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1. Meios de cultura e Soluções</b>	<b>38</b>
2.1.1. Meios de cultura	38
2.1.2. Soluções de Antibiótico	42
2.1.3 Soluções <i>stock</i> e tampões de pH	43
<b>2.2. Área de estudo</b>	<b>45</b>
<b>2.3. Recolha de amostras de água</b>	<b>47</b>
<b>2.4. Quantificação, isolamento e identificação microbiológica</b>	<b>47</b>
2.4.1. Método de filtração por membrana	48
2.4.2. Quantificação das estirpes bacterianas	49
2.4.3 Identificação das estirpes bacterianas	51
2.4.4. Medição dos valores de pH	52
<b>2.5. Testes de suscetibilidade antimicrobiana – Método de difusão em disco (<i>Kirby-Bauer</i>)</b>	<b>53</b>
2.5.1. Índice de multirresistência antimicrobiana (MDR)	53
<b>2.6. Transconjugações</b>	<b>54</b>
<b>2.7. Biologia Molecular</b>	<b>54</b>
2.7.1. Extração DNA total de <i>E.coli</i>	54
2.7.2. Determinação da concentração e pureza de DNA por espectrofotometria	55

## 2. Material e Métodos

A área abrangida pelo presente estudo foi o estuário do rio Douro e praias costeiras da Foz e Matosinhos.

O Douro é um rio internacional e dos mais longos existentes na Península Ibérica com um curso de 930Km. A sua bacia hidrográfica de 98000Km<sup>2</sup> é partilhada entre Portugal e Espanha (Madureira *et al.*, 2010). Este desagua no Oceano Atlântico na costa noroeste de Portugal, perto da cidade do Porto (41.14°N e 8.66°O) (Azevedo *et al.*, 2008). No decorrer dos anos foram construídas mais de 50 barragens hidroelétricas ao longo do seu curso. A barragem de Crestuma foi construída em 1985 a 21,6Km a jusante da Foz, reduzindo significativamente o tamanho do estuário (Azevedo *et al.*, 2010). O estuário é dividido em três zonas nomeadamente estuário superior, médio e inferior (Ilustração XI) (Vieira and Bordalo, 2000). O estuário é alvo de altas pressões antropogénicas resultantes à grande urbanização e densidade populacional das cidades do Porto e Gaia, industrialização, descargas de esgotos não sujeitos a tratamento e drenagem direta ou indireta de efluentes provenientes de estações de tratamento de águas residuais (ETARs) sem remoção de nutrientes (Azevedo *et al.*, 2008). Existem no total oito ETARs sitas ao longo do estuário sendo as maiores a ETAR das Sobreiras e a ETAR do Freixo, localizadas no baixo e médio estuário respetivamente (Madureira *et al.*, 2010).

Os processos de análise microbiológica das amostras de água foram efetuados no Laboratório de Tecnologia Alimentar do Instituto de Ciências Abel Salazar.

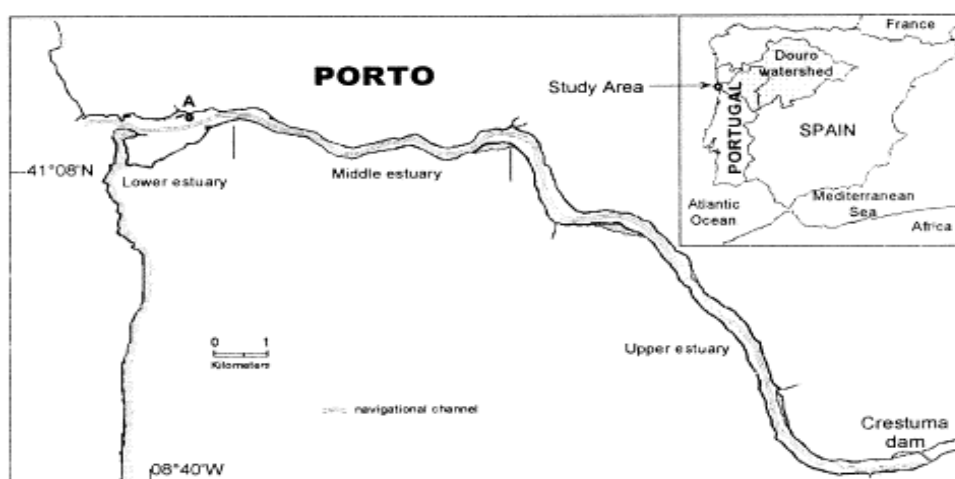


Ilustração XI- Bacia Hidrográfica e Estuário do Rio Douro. **Fonte** Vieira and Bordalo (2000).

## 2.1. Meios de cultura e Soluções

### 2.1.1. Meios de cultura

A análise microbiológica das amostras ambientais de água tem como pressupostos o isolamento, enumeração, caracterização e identificação dos microrganismos de interesse para no estudo. Foram selecionados meios de cultura sólidos e líquidos, com propriedades seletivas, diferenciais ou de enriquecimento para crescimento e desenvolvimento de *E. coli* e enterococos.

#### 2.1.1.1. Água peptonada tamponada (APT)

A água peptonada é um meio de cultura não seletivo de pré-enriquecimento utilizado previamente ao isolamento e sementeira de microrganismos visando o seu crescimento e desenvolvimento. É utilizado como meio de recuperação de células com lesões devido a técnicas como filtração por membrana.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (Biokar Diagnostics) e posteriormente autoclavado em tubos a 121°C, durante 15 minutos.

#### 2.1.1.2. Brilliant green bile (2%) broth (BGBB)

O caldo de bÍlis verde brilhante é um meio de cultura líquido para a deteção e identificação de microrganismos da família das *Enterobacteriaceae* em vários tipos de amostras. A sua constituição por sais biliares e verde brilhante inibe o crescimento de microrganismos Gram-positivo. O teste de identificação de *E. coli* é efetuado à temperatura de incubação de 44°C, durante o período de 24h.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as instruções do fabricante (OXOID) sendo posteriormente autoclavado em tubos a 121°C, durante 15 minutos.

#### *2.1.1.3. Ethyl violet azide broth (Litsky)*

O meio de *Litsky* é um meio seletivo específico para detecção e identificação de enterococos. A sua seletividade prende-se à composição por violeta de etilo e azida de sódio que inibe o crescimento de outras bactérias Gram-positivo. A peptona serve como fonte de carbono, nitrogénio, vitaminas e minerais permitindo o desenvolvimento dos microrganismos.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (Biokar Diagnostics) sendo posteriormente autoclavado em tubos a 121°C, durante 15 minutos.

#### *2.1.1.4 Kanamycin aesculin azide medium (KAA)*

O meio de KAA é um meio de cultura seletivo para o isolamento e enumeração de enterococos em amostras de água e outros espécimes. A seletividade é conferida pelos componentes sulfato de kanamicina e azida de sódio que inibem o crescimento de bactérias Gram-negativo. A esculina é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -D-glucosidase com produção e libertação de esculetina (6,7-dihidroxicoumarina) que reage com os iões de  $Fe^{3+}$  e dá origem a um complexo de coloração preta em redor da colónia (Doming *et al.*, 2003). As colónias de morfologia redonda e coloração branca ou cinzenta, com zonas circulares negras de pelo menos 1cm de diâmetro são consideradas como presumíveis enterococos.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (OXOID) e posteriormente autoclavado a 121°C, durante 15 minutos.

#### 2.1.1.5. *Mieller Hinton (MH)*

O meio de MH é o meio de cultura recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana pelo método de difusão direta em disco (*Kirby-Bauer*). A sua composição é rica em infusão de carne e ácido de caseína hidrolisado favorecem o crescimento da maioria dos microrganismos patogénicos. O amido tem um papel importante na absorção dos metabolitos tóxicos resultantes do crescimento bacteriano.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (OXOID) e esterilizado a 121°C, durante 15 minutos. Posteriormente foi estabilizado em banho-maria a 55°C durante 30 minutos.

#### 2.1.1.6. *Plate Count Agar (PCA)*

O meio PCA é um meio de cultura nutritivo não seletivo recomendado pela norma europeia (EN) *International Organization for Standardization* (ISO) 6222:1999 para a deteção e enumeração de microrganismos totais cultiváveis presentes em amostras de água.

Este meio foi reconstituído tendo em consideração as indicações do fabricante (Biokar Diagnostics) sendo posteriormente autoclavado a 121°C, durante 15 minutos.

#### 2.1.1.7. *Slanetz and Bartley Agar (SB)*

O meio de SB é seletivo e diferencial para o desenvolvimento de enterococos. Este é recomendado pela EN ISO 7899-2 para deteção e enumeração de enterococos em amostras de água pela técnica da membrana filtrante. O agente seletivo é a azida de sódio que inibe o crescimento de bactérias Gram-negativo. As colónias de coloração avermelhada ou castanha, coloração resultante da redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), são consideradas como presumíveis *Enterococcus* spp.

O enriquecimento do meio de cultura com vancomicina (6mg/mL) permite a seleção de estirpes de enterococos com resistência a este antimicrobiano.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (OXOID). Previamente ao enriquecimento com antimicrobiano foi colocado em banho-maria à temperatura de 50°C.

#### *2.1.1.8. Tryptic Soy Agar and Broth (TSA and TSB)*

O meio de TSA é um meio nutritivo sólido constituído por agar ao contrário do meio de TSB que se apresenta sob a forma líquida. Estes meios permitem o crescimento e desenvolvimento de uma vasta gama de microrganismos. São compostos essencialmente por caseína digerida da soja e é adequado para o crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias.

O meio de TSB é utilizado na conservação das estirpes microbianas juntamente com o glicerol que tem um papel na proteção celular a baixas temperaturas.

O meio de cultura foi reconstituído de acordo com as indicações do fabricante (PANREAC) sendo posteriormente autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

#### *2.1.1.9. Tryptone Bile X-glucuronide Agar (TBX)*

O meio de TBX é um meio de cultura seletivo e diferencial cromogénico utilizado na deteção e enumeração de *E. coli*. A seletividade é conferida pela presença de sais biliares que impedem o crescimento e desenvolvimento de microrganismos Gram-positivo. A enzima glucuronidase é produzida especificamente por *E. coli*, o que permite a sua diferenciação dos restantes coliformes fecais. O cromogénio presente no meio é o 5-bromo-4-cloro-3-indol-beta-D-glucuronideo, que é absorvido e hidrolisado no interior das células. O cromóforo é libertado e acumula-se conferindo a coloração azul/esverdeada às colónias de *E. coli*.

Este meio pode ser enriquecido com antimicrobianos para selecionar estirpes que apresentam resistência aos mesmos. A seleção de estirpes produtoras de beta-lactamases foi realizada através do enriquecimento do meio de cultura com agentes antimicrobianos como a ampicilina (16µg/mL), ciprofloxacina (4µg/µL) e cefotaxima (2µg/mL).

O meio de cultura foi manipulado segundo as indicações de fabricante (OXOID) sendo posteriormente autoclavado a 121°C, durante 15 minutos. Previamente ao enriquecimento com antimicrobianos o meio foi colocado em banho-maria a 50°C.

## 2.1.2. Soluções de Antibiótico

### 2.1.2.1. Solução de ampicilina sódica (AMP)

A solução *stock* de AMP (PANREAC) foi preparada com a concentração de 16mg/mL. Nas placas de TBX enriquecidas com este antimicrobiano para seleção das estirpes de *E. coli* produtoras de beta-lactamases foi adicionado 1µL de solução, por cada mililitro de meio de cultura.

### 2.1.2.2. Solução de azida sódica (AZ)

A solução *stock* de azida sódica de concentração 50 mg/mL foi preparada pela adição de 500mg de azida sódica (PANREAC) a 10mL de água destilada. A solução foi filtrada com seringa e filtro de porosidade 0,22 µm estéreis e foi conservada a -20°C.

### 2.1.2.3. Solução de cefotaxima (CTX)

A solução *stock* de CTX foi preparada à concentração de 2mg/mL.

### 2.1.2.4. Solução de cicloheximida

A solução *stock* de cicloheximida (BioChemica: AppliChem) foi preparada à concentração de 25mg/mL a partir da adição de 250mg de cicloheximida a 10mL de água destilada. Posteriormente foi filtrada com seringa e filtro de 0,22µm estéreis e conservada a -20°C.

#### *2.1.2.5. Solução de ciprofloxacina (CIP)*

A solução *stock* de CIP foi preparada a 4µg/µL a partir de 4mL de Roxacin® num volume de 100mL de água destilada. A solução foi filtrada e posteriormente preservada à temperatura de -20°C.

#### *2.1.2.6. Solução de vancomicina (VAN)*

A solução *stock* de VAN foi preparada a concentração 6mg/mL.

### 2.1.3 Soluções *stock* e tampões de pH

#### *2.1.3.1. Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0.5M, pH 8.0*

O EDTA é um ácido poliprótico utilizado em várias soluções amortecedoras de pH. Este atua como agente quelante de íons divalentes o que previne a ocorrência de reações intermoleculares e conseqüentemente a desnaturação do DNA.

Para a sua preparação adicionaram-se 46,5g de EDTA (Merck) e 5.0g de NaOH *pellets* (Analar NORMAPUR) em 100mL de água. A solução foi aquecida a 50°C com agitação magnética. Os valores de pH foram aferidos com a adição de uma solução 10N NaOH. Perfez-se o volume até 250mL com água destilada e posteriormente foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

#### *2.1.3.2. Cloreto de sódio (NaCl) 5M*

O NaCl é um composto iônico utilizado juntamente com o etanol em processos de extração de DNA para obtenção de uma maior eficácia na precipitação dos ácidos nucleicos. A solução 5M NaCl foi preparada com 29,2g de NaCl (CARLO ERBA) em 100mL de água destilada. Para dissolução mais eficaz efetuou-se aquecimento a 50°C com agitador magnético. Posteriormente foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

#### 2.1.3.3. Dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%

O SDS é um agente detergente aniônico encontrado na forma de pequenos cristais, utilizado em processos de extração de DNA para solubilização de lípidos e proteínas. Este promove a formação de um ponto nuvem resultante da complexação das proteínas.

A solução foi preparada com 20g de SDS (PANREAC) e perfazendo o volume de 100mL com água destilada. Esta não pode ser autoclavada para evitar a sua polimerização.

#### 2.1.3.4. Etanol absoluto e a 70%

O etanol absoluto é utilizado para recuperação de ácidos nucleicos de soluções aquosas. Este expõe os grupos fosfato com carga negativa. A solução de etanol a 70% é utilizada na lavagem dos ácidos nucleicos para remoção de resíduos proveniente de constituintes celulares. A solução de etanol a 70% foi elaborada a partir de 70mL de etanol absoluto (PANREAC) e perfazendo o volume de 100mL com água destilada.

#### 2.1.3.5. Fenol-clorofórmio 1:1

A solução de fenol-clorofórmio é utilizada em técnicas de extração de DNA genómico. Este desnatura as proteínas com formação de uma camada branca entre a fase aquosa e orgânica. Os ácidos nucleicos constituem a fase aquosa enquanto os lípidos, polissacarídeos e proteínas complexadas ao SDS permanecem retidos na fase fenólica.

A solução foi preparada com igual quantidade de fenol (MERCK) e clorofórmio (BDH Prolabo), neste caso 50mL. Os seus constituintes são agentes químicos com propriedades tóxicas, corrosivas, irritantes mutagénicas e carcinogénicas. Foram manuseados com máxima precaução numa *hotte* e com a utilização de todo o equipamento de proteção individual recomendado, nomeadamente luvas de nitrilo e máscara de proteção.

#### *2.1.3.6. Sódio-Tris-EDTA (STE)*

O tampão de STE foi preparado a partir de 10mM de Tris-HCl (pH 8.0), 1mM de EDTA (pH 8.0) e 0,1 M NaCl. Posteriormente foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

#### *2.1.3.7. Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS-Cl) 1M; pH 8.0*

A solução 1M Tris-HCl foi preparada com a dissolução de 30,3g de base Tris (Merck) em 100mL de água. Ajustou-se o pH através da adição de 10,5mL de ácido clorídrico concentrado (HCl). A solução arrefeceu antes de se proceder a ajustes finais de forma a obter pH 8.0. O volume foi ajustado até 250mL com água destilada. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos.

#### *2.1.3.8. 10x TRIS EDTA (TE), pH 8.0*

A solução tampão 10x TE foi preparada a partir de 100mM de Tris- HCl a pH 8.0 e 10mM de EDTA a pH 8.0. A solução foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos.

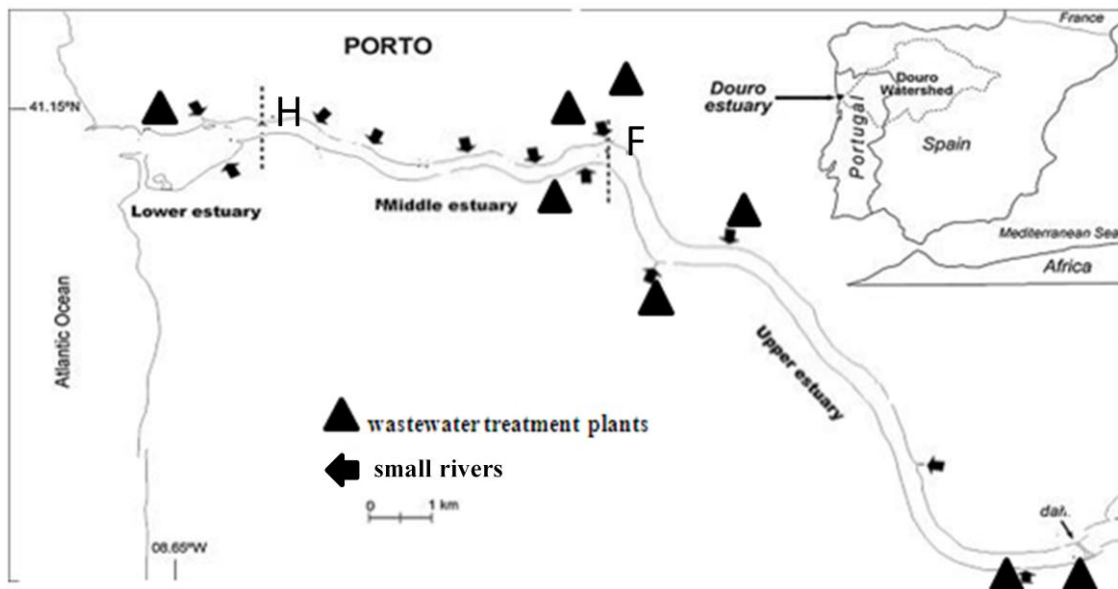
#### *2.1.3.9. Tampão TRIS-Acetato-EDTA 1 x (TAE)*

O tampão TAE é utilizado em eletroforese. Para a sua preparação adicionou-se um volume de 20mL de tampão 50 x TAE e completou-se o volume até 1000mL com água destilada.

## **2.2. Área de estudo**

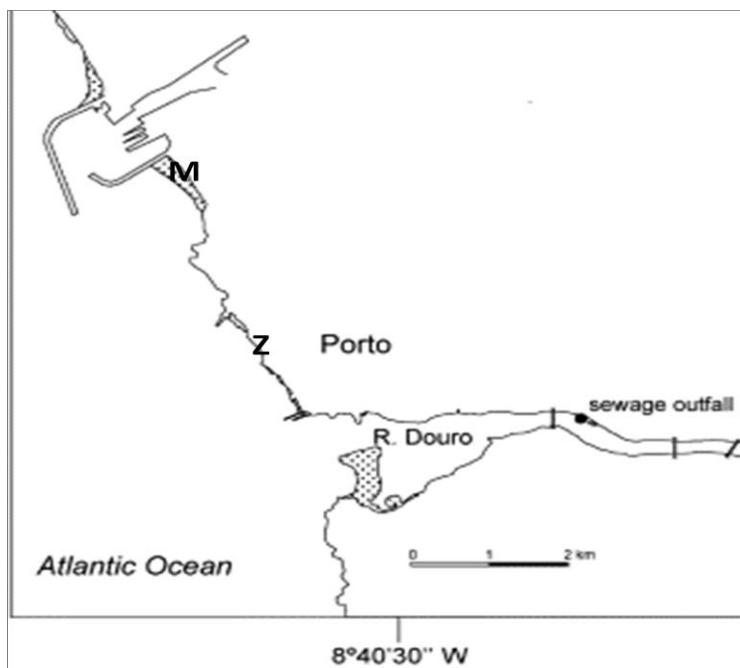
As amostras de água do rio Douro foram recolhidas em dois pontos de amostragem designados por Heliporto e Freixo, localizados na interface do estuário baixo e médio e no médio estuário respetivamente. Efetuaram-se amostragem na Foz – Praia dos Ingleses e na Praia de Matosinhos (Ilustração XII).

A montante do ponto de amostragem Freixo verificou-se um ponto de descarga de efluentes, situada neste local encontra-se a ETAR do Freixo com um fluxo médio diário de 35.900m<sup>3</sup> (Madureira *et al.*, 2010). Os últimos 9Km do estuário são caracterizados por uma alta densidade populacional com mais de 700.000 habitantes divididos entre as cidades do Porto e Gaia. Ao longo do curso do Rio Douro desaguam outros rios mais pequenos em particular na zona do médio estuário, onde se situa o ponto de amostragem Heliporto.



**Ilustração XII-** Localização dos pontos de amostragem no estuário do rio Douro, Porto, Portugal; F- Freixo (41°08'35.21"N; 8°34'39.22"O); H- Heliporto (41°08'49.33"N; 8°37'58.94"O) e das estações de tratamento de águas residuais e pequenos rios. **Adaptado de** Azevedo e colaboradores (2008 e 2010).

As praias costeiras localizadas na orla costeira sofrem uma grande influência de águas provenientes dos rios Douro e Leça, ribeiras de Riguinha e Carcavelos, bem como da sua proximidade com o porto de Leixões (Ilustração XIII). Esta região foi alvo de contaminação acentuada devido à descarga de esgotos diretamente na água. O tratamento das águas residuais e a construção de redes de saneamento contribuiu bastante para a melhoria da qualidade da água na atualidade.



**Ilustração XIII-** Localização dos pontos de amostragem na Orla costeira, M- Praia de Matosinhos (41°10'34.37"N;8°42'06.45"O); Z- Praia dos Ingleses (41°09'02.71N 8°40'37.56"O), Porto, Noroeste de Portugal. **Adaptado de** Bordalo (2003).

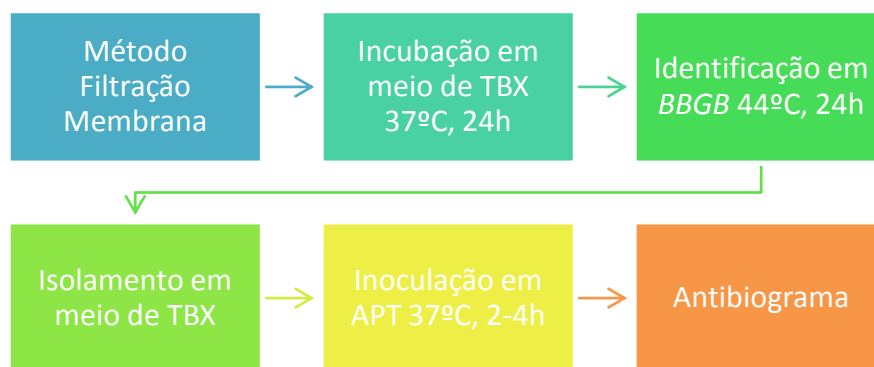
### 2.3. Recolha de amostras de água

A colheita de amostras de água foi efetuada segundo as especificações do Decreto-lei nº135/2009 de 3 de Junho que estabelece o regime jurídico de identificação, gestão, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares. A recolha foi realizada assepticamente com recipientes de vidro estéreis com capacidade de 1000mL, 30 cm abaixo da superfície da água e onde a profundidade era no mínimo de 1m. O transporte foi efetuado ao abrigo da exposição solar e à temperatura de refrigeração. A análise foi realizada no menor intervalo de tempo possível após a colheita, no máximo após 4h.

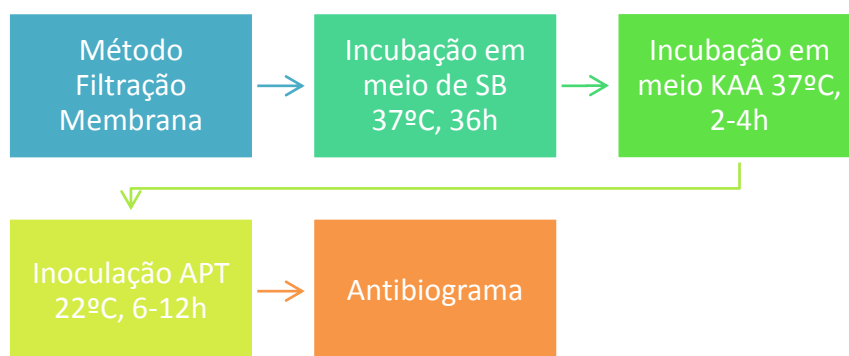
### 2.4. Quantificação, isolamento e identificação microbiológica

Neste estudo procedeu-se à quantificação da carga microbiana de *E. coli* e enterococos com recurso a meios seletivos usando a técnica de microfiltração. Efetuou-se também a contagem de microrganismos heterotróficos através de técnicas de microfiltração ou incorporação em agar, consoante a carga microbiana presente. Em algumas amostras foi necessário proceder a diluições para se obterem placas contáveis. Paralelamente

recolheram-se isolados de *E. coli* e enterococos para avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (Ilustrações XIV e XV).



**Ilustração XIV-** Procedimentos para identificação, enumeração, isolamento e avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos de estirpes de *E. coli* presentes em amostras de água.



**Ilustração XV-** Procedimentos para identificação, enumeração e avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos de estirpes de enterococo presentes em amostras de água.

#### 2.4.1. Método de filtração por membrana

O método de filtração por membrana é um dos métodos analíticos de referência na legislação portuguesa pelo Decreto-Lei 135/2009 para a análise microbiológica de águas balneares.

O seu princípio consiste na filtração de um volume de amostra conhecido através de um filtro com uma porosidade de 0,45µm, implicando a consequente retenção dos

microrganismos na sua superfície. Após filtração as membranas foram transferidas para placas de meio seletivo TBX e SB para a detecção de *E. coli* e enterococos, incubadas a 37°C durante 24h e 36h, respectivamente. Para detecção e quantificação de estirpes de *E. coli* resistentes à ampicilina, ciprofloxacina e cefotaxima, efetuou-se a filtração de 100mL da amostra de água e posteriormente transferiram-se as membranas para meio de TBX enriquecido com o agente antimicrobiano correspondente. Para detetar e enumerar as estirpes de VRE filtrou-se um volume de 100mL da amostra e a membrana foi transferida para meio de SB enriquecido com vancomicina (Quadro IV).

**Quadro IV-** Meios de cultura seletivos, diferenciais e enriquecidos com antimicrobianos utilizados para detecção de *E. coli* e enterococos e volumes de filtração da amostra de água (1mL e/ou 100mL de volume filtrado).

<i>E. coli</i>				Enterococos	
TBX	TBX+AMP	TBX+CIP	TBX+CTX	SB	SB+VAN
1-100mL	100mL	100mL	100mL	1-100mL	100mL

#### 2.4.2. Quantificação das estirpes bacterianas

A avaliação quantitativa foi realizada tendo como parâmetro o número de células. Deste modo efetuou-se a contagem direta dos microrganismos em placa. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias (UFC) e para um volume de 100mL (UFC/100mL).

##### 2.4.2.1. Quantificação de *E. coli*

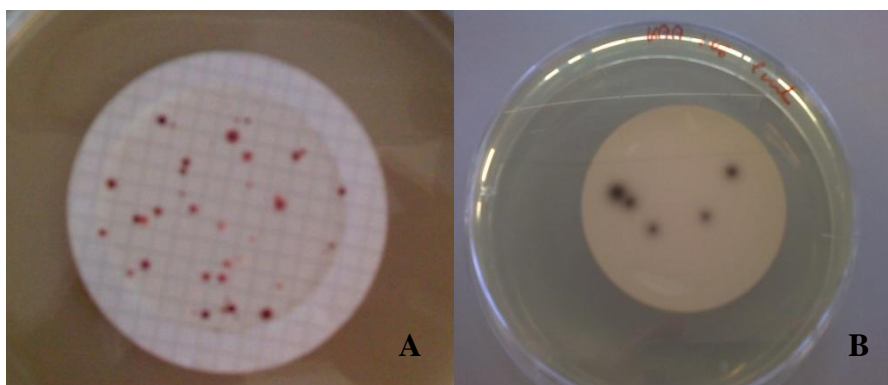
A enumeração de *E. coli* efetuou-se através da contagem direta das colónias com coloração azul/esverdeada nas placas de meio de TBX sem enriquecimento com antimicrobianos e em placas contendo o meio de cultura enriquecido com antimicrobianos (Ilustração XVI).



**Ilustração XVI-** Membrana filtrante com colónias de *E. coli* de coloração azul/esverdeada em meio de TBX.

#### 2.4.2.2. *Quantificação de enterococos e estirpes VRE*

A enumeração de enterococos e estirpes VRE foi efetuada após transferência da membrana (previamente incubada em meio de SB e SB enriquecido com vancomicina, respetivamente) para uma placa de meio de KAA pré-aquecida a 44°C e incubação a 37°C durante 2-4 horas. Foram consideradas as colónias com halo negro em redor como presumíveis enterococos (Ilustração XVII).



**Ilustração XVII-** Membranas filtrantes com colónias de enterococos. A) Colónias de enterococos vermelhas/acastanhadas em meio de SB; B) colónias de enterococos esculina positivo em meio de KAA.

#### 2.4.2.3. *Quantificação de Microrganismos Totais*

A enumeração de microrganismos heterotróficos a 22°C e 37°C realizou-se após sementeira por incorporação de um volume conhecido da amostra em meio de cultura PCA. Realizaram-se diluições decimais sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) nas amostras onde se

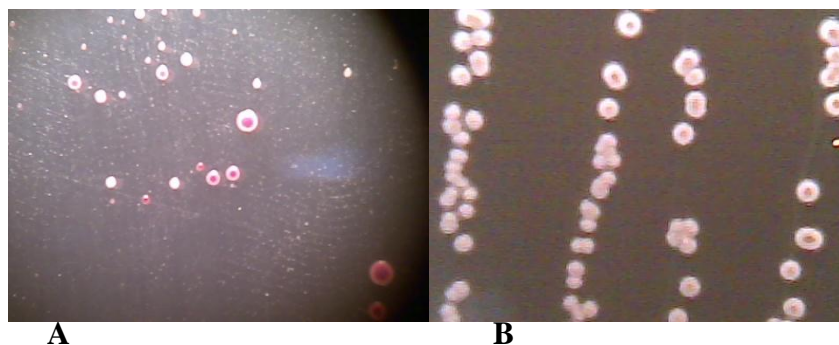
esperava maior carga microbiana. Para tal, retirou-se 1mL de amostra com uma pipeta esterilizada e adicionou-se a 9mL de água triptona e assim sucessivamente. Posteriormente, retira-se 1mL diretamente da amostra e de cada diluição para a placa de Petri em replicado e adiciona-se o meio de cultura. A incubação é efetuada a 37°C durante 48h e a 22°C durante 72h.

### 2.4.3 Identificação das estirpes bacterianas

#### 2.4.3.1. Análise macroscópica da morfologia das colónias

A análise macroscópica das colónias efetuou-se segundo a morfologia e coloração apresentada pelas colónias tendo em consideração o meio de cultura.

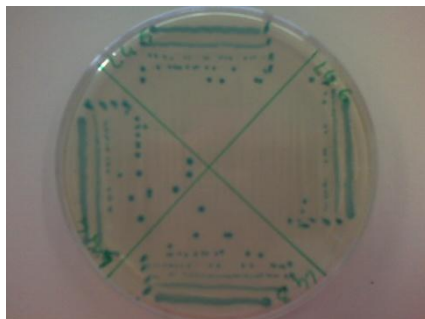
As colónias redondas de coloração azul/esverdeada foram consideradas indicativas da presença de *E. coli* em meio de TBX. Em meio de SB as colónias de coloração vermelha e castanha foram consideradas como presumíveis enterococos. Em meio de KAA as estirpes de enterococos apresentaram-se segundo colónias redondas brancas de centro castanho ou cinzento (Ilustração XVIII).



**Ilustração XVIII-** Colónias de enterococos. A) Colónias redondas vermelhas e castanhas em meio de SB; B) Colónias redondas brancas com centro castanho em meio de KAA.

#### 2.4.3.2. Isolamento de estirpes bacterianas

O isolamento das estirpes de *E. coli* e enterococos efetuou-se pela técnica do riscado com esgotamento do inóculo (Ilustração XIX).



**Ilustração XIX-** Isolamento de colónias de *E. coli* em meio de TBX pela técnica do riscado com esgotamento do inóculo mediante estrias horizontais e paralelas entre si

#### 2.4.3.3. Identificação de *E. coli*

A identificação e confirmação bioquímica de *E. coli* efetuou-se em caldo de bÍlis verde brilhante e é considerado um resultado positivo a presença de turbidez após incubação a 44°C durante 24h.

#### 2.4.3.4. Identificação de enterococos

A identificação bioquímica de enterococos realizou-se através da incubação da estirpe pretendida no meio de *Litsky* em banho-maria à temperatura 44°C, durante 24h. Na presença de turbidez considerou-se o resultado positivo para a presença de enterococos.

#### 2.4.4. Medição dos valores de pH

O pH é um importante parâmetro físico no crescimento e desenvolvimento dos microrganismos. Foi realizada a sua medição em todas as amostras de água recolhidas.

## 2.5. Testes de suscetibilidade antimicrobiana – Método de difusão em disco (*Kirby-Bauer*)

O método utilizado para avaliar a suscetibilidade das estirpes de *E. coli* e enterococos foi o de difusão em disco também designado por *Kirby-Bauer*. Este tem como finalidade determinar se a estirpe em estudo é sensível ou apresenta um perfil de resistência aos antimicrobianos testados. Este método foi realizado segundo as especificações do CLSI. Efetuou-se a inoculação de uma suspensão bacteriana equivalente a 0,5 McFarland na superfície de meio de MH, com espessura de 4mm. Para avaliar a suscetibilidade das estirpes de *E. coli* foram distribuídos discos com 19 antimicrobianos pertencentes a classes distintas na superfície do meio inoculado: ampicilina (AMP, 10µg), cefalotina (KF, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), ceftazidima (CAZ, 30µg), aztreonamo (ATM, 30µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 20/10µg), imipenemo (IPM, 10µg) gentamicina (CN, 10µg), tobramicina (TOB, 10µg), amicacina (AK, 30µg), estreptomicina (STR, 10µg), kanamicina (K, 30µg), ácido nalidixico (NA, 30µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), cloranfenicol (CHL, 30µg), nitrofurantoína (F, 300µg), trimetoprim/sulfametoxazol (SXT, 1,25/23.75) e tetraciclina (TET, 30µg) (Oxoid). As estirpes de enterococos foram avaliadas quanto à sua suscetibilidade a 12 antimicrobianos: ampicilina (AMP, 10µg), azitromicina (AZM, 15µg), gentamicina (CN, 10µg), rifampicina (RD, 5µg), quinupristina/dalfopristina (QD, 15µg), ciprofloxacina (CIP, 30µg), tetraciclina (TET, 30µg), eritromicina (ERY, 15µg), cloranfenicol (CHL, 30µg), nitrofurantoína (F, 300µg), vancomicina (VAN, 30µg) e teicoplanina (TEC, 30µg) (Oxoid). Após incubação a 37°C durante 18 horas, determinou-se o diâmetro dos halos, sendo o resultado expresso em suscetível (S), intermédio (I) ou resistente (R).

### 2.5.1. Índice de multirresistência antimicrobiana (MDR)

O índice de multirresistência a antimicrobianos foi determinado através da razão entre o valor total de resistências expressas pelo isolado testado e o total de agentes antimicrobianos aplicados no teste de suscetibilidade antimicrobiana (Krumperman, 1983; Florea, 2011).

## 2.6. Transconjugações

As transconjugações foram realizadas de acordo com as experiências desenvolvidas por Wang e colaboradores (2004). Estirpes de *E. coli* J53AzR foram utilizadas como recetoras e as estirpes *E. coli* com fenótipo de resistência a AMP como dadoras. As estirpes recetoras foram incubadas *overnight* a 37°C com agitação, em meio de TSB com 100µg/mL de azida de sódio e as dadoras em meio de TSB com 50µg/mL de ampicilina. Posteriormente colocou-se 0,5mL de cada estirpe num tubo com 4mL de TSB sem enriquecimento e incubou-se *overnight* a 37°C sem agitação. Efetuou-se o isolamento das estirpes de *E. coli* J53AzR com plasmídeo resistente em meio de TSA enriquecido com 100µg/mL de azida sódica, 50µg/mL de ampicilina e cicloheximida.

## 2.7. Biologia Molecular

### 2.7.1. Extração DNA total de *E.coli*

Na extração de DNA total de *E. coli* inoculou-se as estirpes em 10mL de meio de TSB que incubou *overnight* a 37°C. Transferiu-se 1,5mL do inóculo para um microtubo e centrifugou-se a 5000 rpm durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e repetiu-se os passos anteriores com o objetivo de concentrar o *pellet*. Rejeitar o sobrenadante e ressuspender em 750µL de STE adicionando-se posteriormente 60µL de SDS a 10% com leve agitação. Incubar em banho-maria a 56°C durante 10 minutos. Arrefecer a temperatura ambiente e adicionar 500µL de fenol – clorofórmio 1:1 e agitar no vórtex observando-se uma solução branca. Centrifugar a 10000rpm durante 5 minutos. Vai-se observar a formação de uma fase aquosa no cimo do tubo, uma fase intermédia onde se encontram as proteínas desnaturadas e uma fase fenólica onde se concentram outras moléculas. Retira-se 500µL da fase aquosa para outro microtubo ao qual se adiciona 100µL de 5M NaCl e 900µL de etanol absoluto a -20°C para precipitar os ácidos nucleicos. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos e rejeitar o sobrenadante. Lavagem dos precipitados com 100µL de etanol a 70% a -20°C. Centrifugar novamente a 10000 rpm 5 minutos e rejeitar o sobrenadante. Deixar secar a temperatura ambiente durante 30 minutos ou incubar a 37°C durante 5 minutos. É importante que toda a quantidade de etanol evapore totalmente para o DNA não ficar com partículas voláteis o

que interfere na corrida de eletroforese devido ao baixo peso molecular gerado. Dissolver o DNA em tampão TE, conforme a quantidade de *pellet* observada, tendo-se acrescentado cerca de 30µL do mesmo.

### 2.7.2. Determinação da concentração e pureza de DNA por espectrofotometria

A espectrofotometria é utilizada como método para determinar a concentração de DNA presente numa amostra, bem como o seu grau de pureza.

O DNA apresenta grande atividade de absorvância a 260nm. A este comprimento de onda é possível estimar-se a concentração presente na amostra. À densidade ótica (OD) de 1 corresponde a concentração de 50µg/mL. Assim, a quantidade de DNA presente é dada através da seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = 50\mu\text{g/mL} \times \text{Diluição} \times A_{260\text{nm}}$$

O ratio de 260/280 (OD<sub>260</sub>:OD<sub>280</sub>) possibilita a estimativa do grau de pureza dos ácidos nucleicos da amostra. Pode ocorrer a contaminação por outros compostos como proteínas, fenol ou RNA. No caso das proteínas o grau de contaminação teria que ser muito significativo para induzir variabilidade nos valores de absorvância a 260nm. Preparações com valores de OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> entre 1,8 e 2,0. Valores abaixo podem significar contaminação por fenol ou proteínas. São necessárias concentrações de DNA de cerca de 1µg/mL para se obterem resultados fiáveis a A<sub>260nm</sub> (Sambrook and Russell, 2001).



# **Capítulo III**

## **Resultados**

## **Capítulo III**

<b>3. Resultados</b> .....	<b>59</b>
<b>3.1. Incidência de estirpes bacterianas em amostras de água do rio Douro e orla costeira</b>	<b>59</b>
3.1.1. Valores médios de bioindicadores de contaminação fecal em cada ponto de amostragem	59
3.1.2. Variação dos valores de bioindicadores de contaminação fecal ao longo do período de amostragem	62
3.1.3. Parâmetros físico-químicos (pH) e relação com valores de estirpes bacterianas	69
<b>3.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de <i>E. coli</i> e enterococos aos agentes antimicrobianos</b>	<b>75</b>
3.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de <i>E.coli</i>	76
3.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de enterococos	77
3.2.3. Fenótipos associados a multirresistência a antimicrobianos	78

### **3. Resultados**

#### **3.1. Incidência de estirpes bacterianas em amostras de água do rio Douro e orla costeira**

##### **3.1.1. Valores médios de bioindicadores de contaminação fecal em cada ponto de amostragem**

O número de células microbianas variou de acordo com a localização do ponto de amostragem, condições meteorológicas e valores de pH da água. Numa perspetiva geral da análise dos gráficos I, II e III constatou-se que o valor médio de microrganismos foi inferior nas amostras de água salgada em comparação com as de água doce. A concentração média de *E. coli* e enterococos foi mais elevada no ponto de amostragem Freixo. Contudo, os níveis de estirpes resistentes foram superiores no ponto de amostragem Heliporto. Verificou-se também que os valores médios de *E. coli* foram superior aos de enterococos.

##### *3.1.1.1. E. coli e estirpes com fenótipo de resistência*

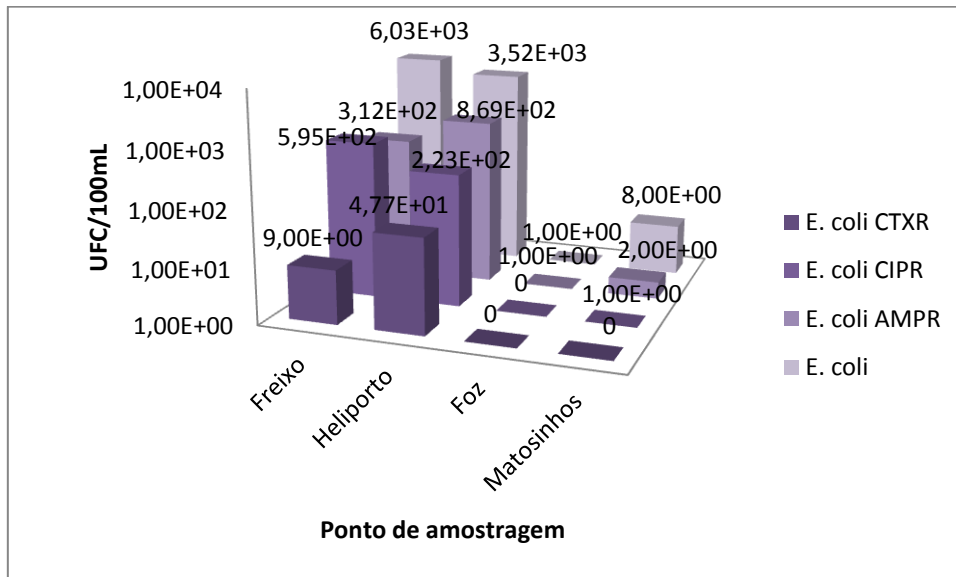
O gráfico I expressa o número médio de *E. coli* e estirpes com fenótipo de resistência obtido nos distintos pontos de amostragem. Os valores mais elevados foram obtidos nos pontos de amostragem Freixo e Heliporto, com  $6,03 \times 10^3$  UFC/100mL e  $3,52 \times 10^3$  UFC/100mL, respetivamente. Os valores mínimos determinaram-se nas amostras de água salgada da Foz com  $1,0 \times 10^0$  UFC/100mL e  $8,0 \times 10^0$  UFC/100mL na praia de Matosinhos.

Constatou-se que as estirpes com fenótipo de resistência à ampicilina e cefotaxima prevaleceram nas amostras de água do Heliporto, com contagens de  $8,69 \times 10^2$  UFC/100mL e  $4,77 \times 10^1$  UFC/100mL. Em comparação as contagens destas estirpes foram mais reduzidas no Freixo, com  $3,12 \times 10^2$  UFC/100mL e  $9,0 \times 10^0$  UFC/100mL, respetivamente. Nas amostras de água salgada da Foz apenas foi detetada uma estirpe

com resistência à ampicilina, e em Matosinhos  $2,0 \times 10^0$  UFC/100mL. Não foram detetadas estirpes com resistência à cefotaxima nestas amostras.

Considerando as estirpes de *E. coli* com fenótipo de resistência à ciprofloxacina verificou-se que estas predominaram no Freixo, com valor médio de  $5,95 \times 10^2$  UFC/100mL e no Heliporto com  $2,23 \times 10^2$  UFC/100mL. Nas amostras de água da Foz não se detetou nenhum isolado com resistência à ciprofloxacina, enquanto em Matosinhos apenas foi encontrado um isolado com este fenótipo de resistência.

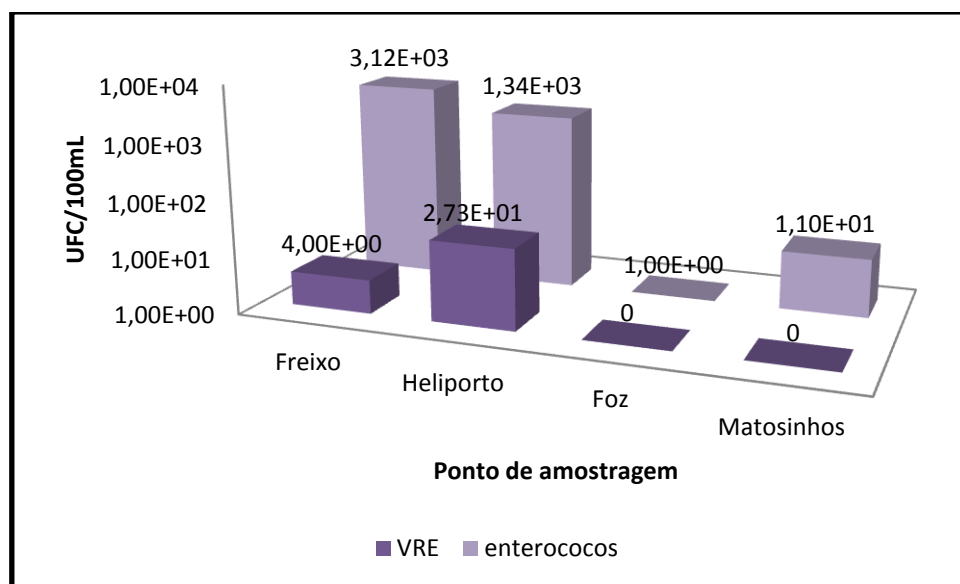
**Gráfico I-** Número médio de *E. coli* e de estirpes com fenótipo de resistência (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto.



### 3.1.1.2. Enterococos e estirpes VRE

O gráfico II expressa o número médio de enterococos e VRE obtido nas amostras de água. Verificou-se que as contagens de enterococos foram mais elevadas no Freixo e Heliporto com  $3,12 \times 10^3$  UFC/100mL e  $1,34 \times 10^3$  UFC/100mL, respetivamente. Nas amostras de água da Foz apenas foi detetada uma estirpe de enterococos e em Matosinhos as contagens apresentaram-se na ordem dos  $1,1 \times 10^0$  UFC/100mL. Constatou-se que o valor médio de estirpes VRE foi mais elevado no Heliporto com  $2,73 \times 10^1$  UFC/100mL em relação às determinadas no Freixo,  $4,0 \times 10^0$  UFC/100mL. Nas amostras de água de ambas as praias não foram detetadas estirpes VRE.

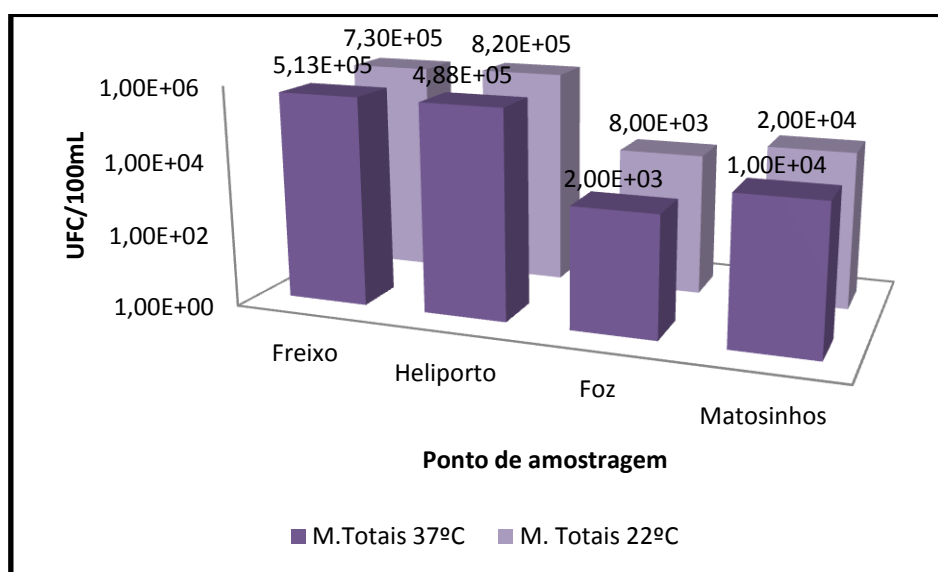
**Gráfico II-** Número médio de enterococos e de estirpes VRE (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto.



### 3.1.1.3. *Microrganismos Totais*

O gráfico III expressa o número médio de microrganismos heterotróficos totais verificando-se contagens mais elevadas nos locais de amostragem Freixo e Heliporto comparativamente às obtidas nas amostras de água salgada.

**Gráfico III-** Número médio de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto.



### 3.1.2. Variação dos valores de bioindicadores de contaminação fecal ao longo do período de amostragem

As amostragens foram realizadas entre o mês de Abril e Julho, durante o período matinal. Na praia dos Ingleses da Foz e de praia de Matosinhos, apenas que realizou uma amostragem, devido a condições meteorológicas adversas e inseguras.

#### 3.1.2.1. *Freixo*

Neste local efetuaram-se quatro amostragens, compreendidas entre o dia 23 de Abril e 26 de Junho. Os processos de análise foram ajustados ao longo do trabalho pelo que no início procedeu-se à deteção de estirpes com resistência à ampicilina e ciprofloxacina, devido a eventos de co-expressão de resistência a beta-lactâmicos e fluoroquinolonas.

Posteriormente modificou-se a estratégia de trabalho e procedeu-se à detecção das estirpes de *E. coli* com resistência à cefotaxima, uma vez que o meio enriquecido com este antimicrobiano possibilita mais facilmente a seleção de estirpes produtoras de ESBLs e AmpCs. No decorrer das amostragens efetuadas no mês de Junho não se quantificou o microrganismo *E. coli* com fenótipo de resistência às fluoroquinolonas.

#### *3.1.2.1.1. E. coli e estirpes com fenótipo de resistência*

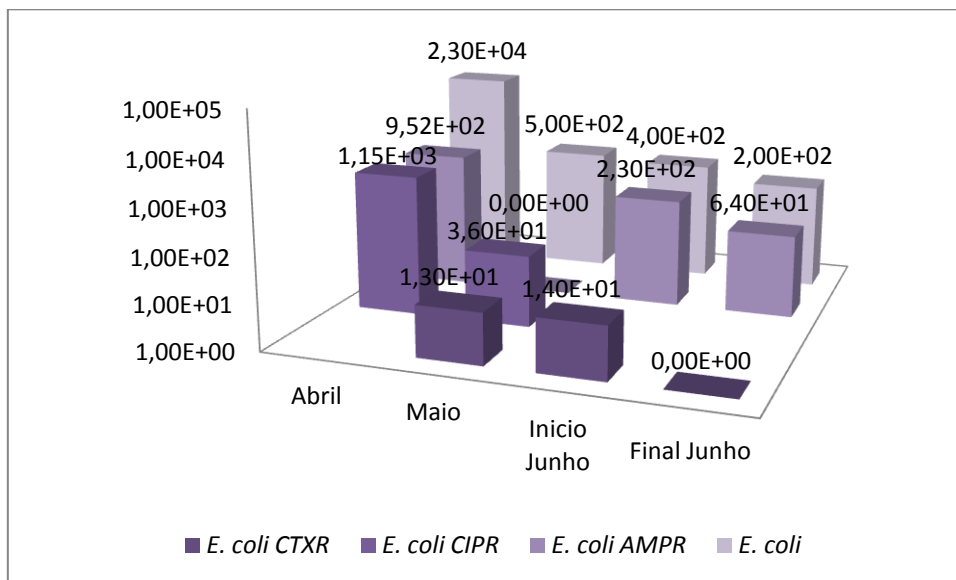
Na análise do gráfico IV constatou-se que no mês de Abril as contagens de *E. coli* atingiram um valor máximo de  $2,30 \times 10^4$  UFC/100mL e no final de Junho o valor mínimo de  $2,0 \times 10^2$  UFC/100mL.

As estirpes com fenótipo de resistência à ampicilina e ciprofloxacina foram superiores no mês de Abril com  $9,50 \times 10^2$  UFC/100mL e  $1,15 \times 10^3$  UFC/100mL, respetivamente. No mês de Maio constatou-se um decréscimo acentuado dos níveis de todos os microrganismos.

No mês subsequente as contagens de *E. coli* sofreram um decréscimo até  $4,00 \times 10^2$  UFC/100mL. O valor de estirpes com resistência à ampicilina foi de  $2,30 \times 10^2$  UFC/100mL. Verificou-se que as contagens de estirpes com fenótipo de resistência à cefotaxima aumentam para  $1,40 \times 10^1$  UFC/100mL.

No final de Junho os níveis de *E. coli* e estirpes com resistência à ampicilina decresceram para  $2,00 \times 10^2$  UFC/100mL e  $6,40 \times 10^1$  UFC/100mL, respetivamente. Não foram detetados microrganismos com fenótipo de resistência à cefotaxima.

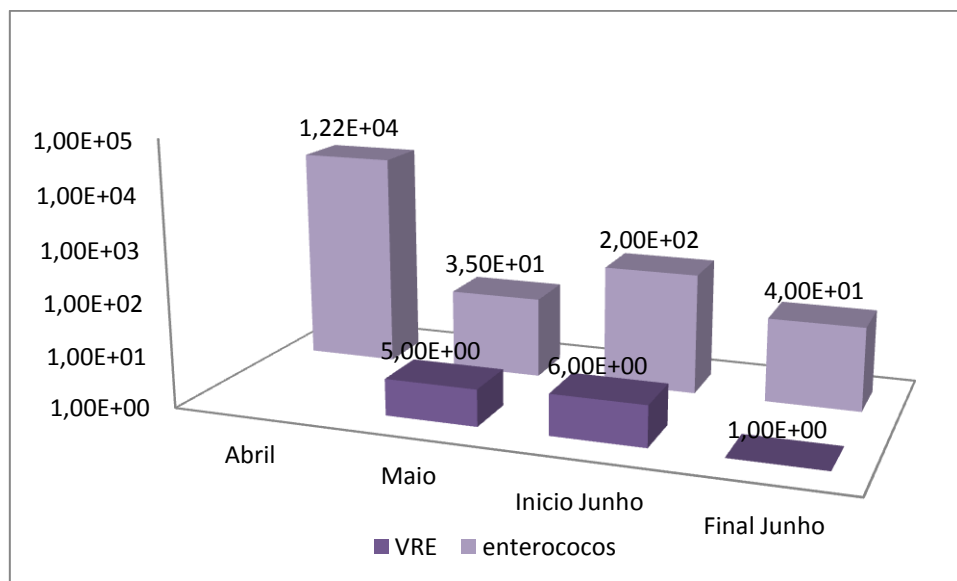
**Gráfico IV-** Número de *E. coli* e de estirpes com fenótipo de resistência (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Freixo) ao longo do período de amostragem.



### 3.1.2.1.2. Enterococos e estirpes VRE

O gráfico V expressa o número de enterococos e estirpes VRE obtido no local de amostragem Freixo ao longo do período de amostragem. No mês de Abril as concentrações de enterococos atingiram o valor máximo de  $1,22 \times 10^4$  UFC/100mL. No mês subsequente decresceram para  $3,5 \times 10^1$  UFC/100mL e as estirpes com fenótipo VRE apresentaram contagens de  $5,0 \times 10^0$  UFC/100mL. No início de Junho observou-se o aumento de ambos os valores. No final do mesmo mês as contagens de enterococos atingiram o valor de  $4,0 \times 10^1$  UFC/100mL e apenas foi detetada uma estirpe com fenótipo VRE.

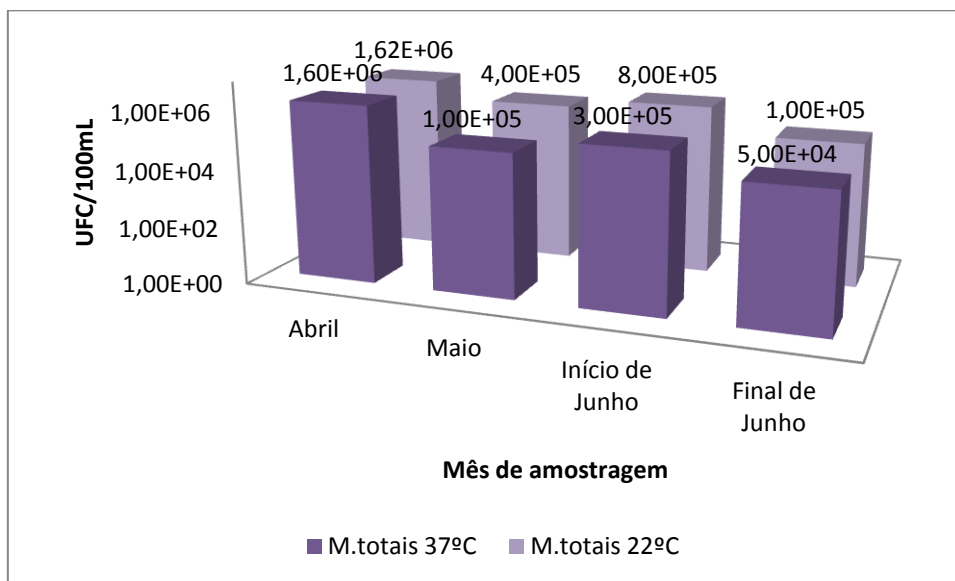
**Gráfico V-** Número de enterococos e de estirpes VRE (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Freixo) ao longo do período de amostragem.



### 3.1.2.1.3. *Microorganismos totais*

O gráfico VI revelou que os valores de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C foram mais elevados em Abril, com  $1,62 \times 10^6$  UFC/100mL e  $1,60 \times 10^6$  UFC/100mL. Em Maio verificou-se que ambas as contagens decresceram. No início de Junho ambos os valores sofreram um aumento para  $8,0 \times 10^5$  UFC/100mL e  $3,00 \times 10^5$  UFC/100mL. No final do mês verificou-se que os microrganismos totais cultiváveis a 22° e 37°C atingiram o valor mínimo de  $1,00 \times 10^5$  UFC/100mL e  $5,00 \times 10^4$  UFC/100mL, respetivamente.

**Gráfico VI-** Número de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Freixo) ao longo do período de amostragem.



### 3.1.2.2. Heliporto

Neste local, foram realizadas na totalidade cinco amostragens, compreendidas entre o início do mês de Abril e final do mês de Julho. Na primeira amostragem não se realizou a deteção/quantificação de estirpes de *E. coli* com fenótipo de resistência à ampicilina, bem como dos microrganismos totais. A quantificação de estirpes de *E. coli* resistentes à cefotaxima e VRE foi realizada a partir do início de Junho.

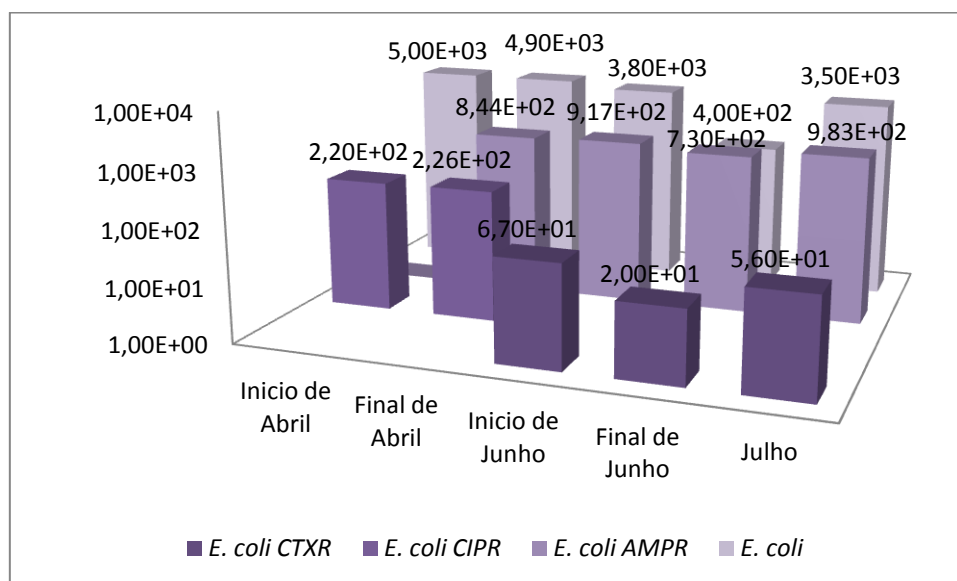
#### 3.1.2.2.1. *E. coli* e estirpes com fenótipo de resistência

Na análise do gráfico VII constatou-se que no início de Abril, as contagens de *E. coli* e estirpes com fenótipo de resistência à ciprofloxacina foram de  $5,00 \times 10^3$  UFC/100mL e  $2,20 \times 10^2$  UFC/100mL, respetivamente. No final do mês, verificou-se o decréscimo dos valores de *E. coli* para  $4,9 \times 10^3$  UFC/100mL e o aumento das contagens de estirpes com resistência à ciprofloxacina para  $2,26 \times 10^2$  UFC/100mL. No mesmo mês verificou-se que as contagens de estirpes com resistência à ampicilina atingiram os  $8,44 \times 10^2$  UFC/100mL.

No mês de Junho, observou-se que os valores de todas as estirpes foram superiores no início do mês. Deste modo as contagens de *E. coli* e estirpes com resistência à ampicilina decresceram de  $3,80 \times 10^3$  UFC/100mL para  $4,0 \times 10^2$  UFC/100mL e  $9,17 \times 10^2$  UFC/100mL para  $7,30 \times 10^2$  UFC/100mL, respetivamente. As estirpes com fenótipo de resistência à cefotaxima sofreram um decréscimo de  $6,70 \times 10^1$  UFC/100mL para  $2,00 \times 10^1$  UFC/100mL.

Em Julho constatou-se o aumento dos valores de todas as estirpes. Os valores de *E. coli* e estirpes com resistência à ampicilina sofreram um incremento para  $3,50 \times 10^3$  UFC/100mL e  $9,83 \times 10^2$  UFC/100mL, respetivamente. As estirpes com resistência à cefotaxima apresentaram contagens de  $5,60 \times 10^1$  UFC/100mL.

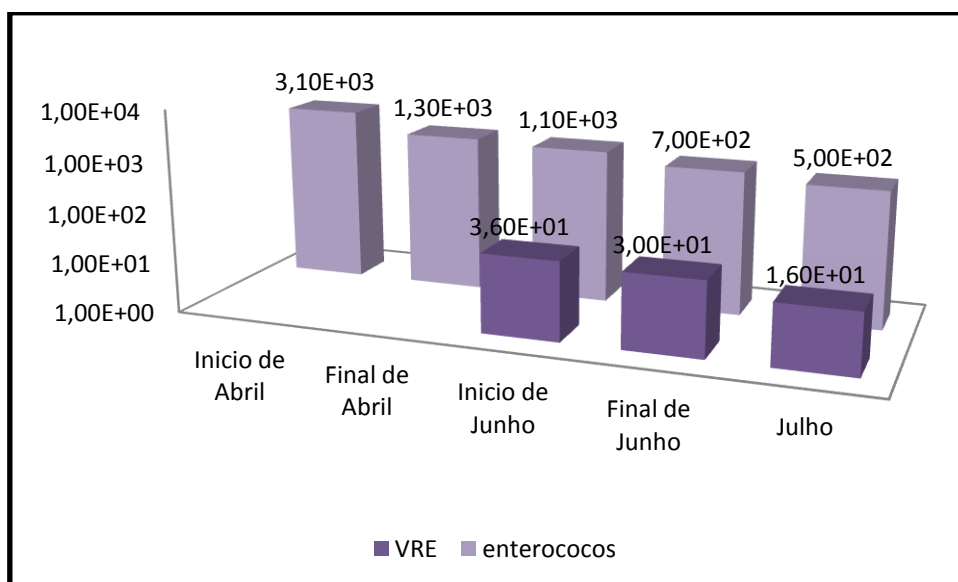
**Gráfico VII-** Número de *E. coli* e de estirpes com fenótipo de resistência (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Heliporto) ao longo do período de amostragem.



### 3.1.2.2.2. Enterococos e estirpes VRE

O gráfico VIII revelou que no início de Abril os enterococos apresentaram valores de  $3,10 \times 10^3$  UFC/100mL, que decresceram para  $1,30 \times 10^3$  UFC/100mL no final do mês. Em Junho observou-se novo decréscimo para  $1,10 \times 10^3$  UFC/100mL e posteriormente para  $7,00 \times 10^2$  UFC/100mL. As estirpes VRE apresentaram contagens de  $3,60 \times 10^1$  UFC/100mL no início de Junho e de  $3,00 \times 10^1$  UFC/100mL no final. No mês de Julho ambos os valores de enterococos e estirpes VRE sofreram um decréscimo para  $5,00 \times 10^2$  UFC/100mL e  $1,60 \times 10^1$  UFC/100mL, respetivamente.

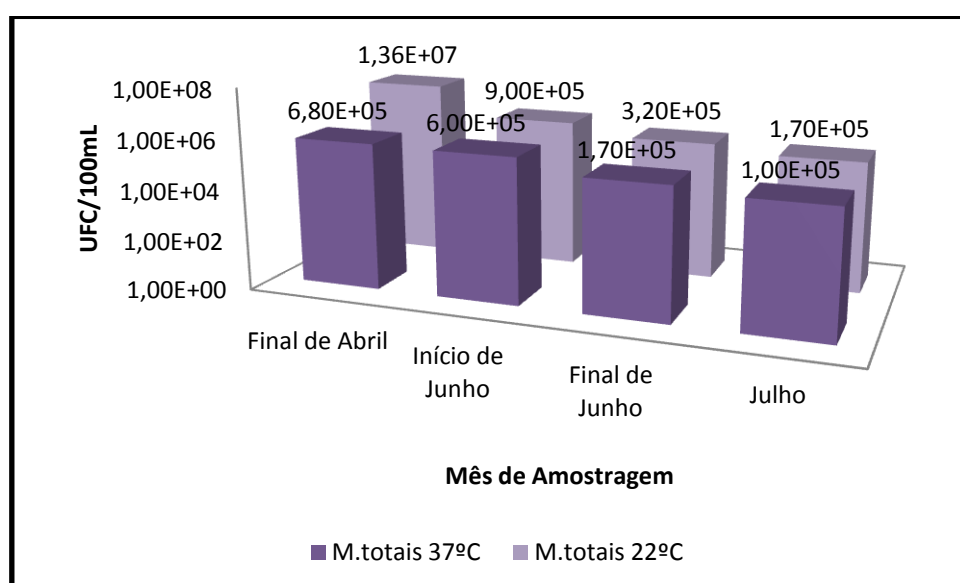
**Gráfico VIII-** Número de enterococos e estirpes VRE (UFC/100mL) em amostras de água de água do rio Douro (Heliporto) ao longo do período de amostragem.



### 3.1.2.2.3. Microrganismos totais

Na análise do gráfico IX constatou-se que os microrganismos cultiváveis a 22°C e 37°C atingiram os valores máximos em Abril. Durante o mês de Junho as contagens sofreram um decréscimo. No mês subsequente estes microrganismos atingiram os valores mínimos de  $1,70 \times 10^5$  UFC/100mL e  $1,00 \times 10^5$  UFC/100mL, respetivamente.

**Gráfico IX-** Número de microrganismos totais cultiváveis a 22°C e 37°C (UFC/100mL) em amostras de água do rio Douro (Heliporto) ao longo do período de amostragem.



### 3.1.3. Parâmetros físico-químicos (pH) e relação com valores de estirpes bacterianas

No quadro V estão expressos os valores de pH medidos nas amostras de água. Constatou-se que no Freixo o valor mínimo foi determinado no final de Abril (7,50) e o máximo em Maio (7,93). Em Junho os valores oscilaram entre 7,62 e 7,70.

No Heliporto o valor mais reduzido foi avaliado no início de Abril (7,49) e o mais elevado no final de Junho (7,80). No final de Abril, início de Junho e Julho estes valores oscilaram entre 7,64, 7,72 e 7,75, respetivamente.

Nas amostragens de água salgada realizadas em Maio verificou-se que os valores de pH na Praia dos ingleses e na Praia de Matosinhos foram de 7,90 e 8,00, respetivamente.

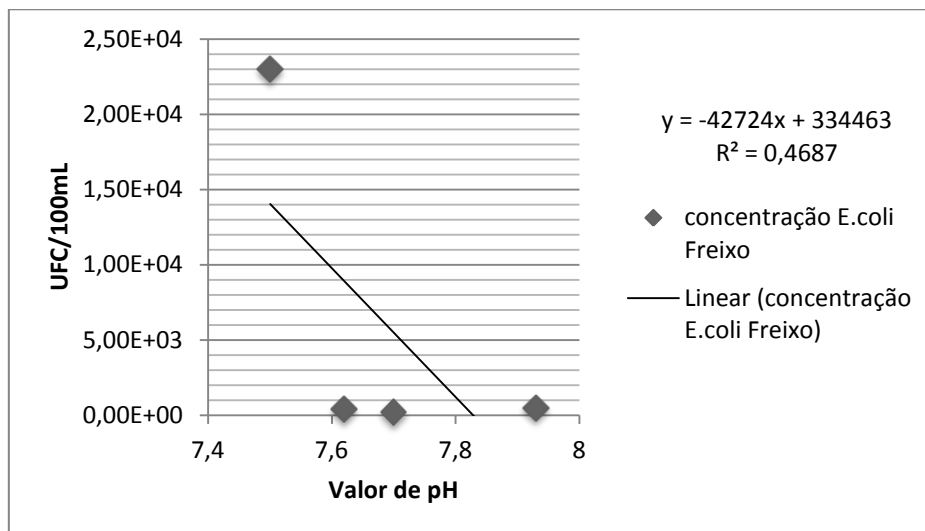
**Quadro V-** Valores de pH mensurados nas amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto.

Data amostragem	Valores de pH obtidos em cada ponto de amostragem			
	Freixo	Heliporto	Foz	Matosinhos
12 Abril	—	7,49	—	—
23 Abril	7,50	7,64	—	—
29 Maio	7,93	—	7,90	8,00
12 Junho	7,62	7,72	—	—
26 Junho	7,70	7,80	—	—
23 Julho	—	7,75	—	—

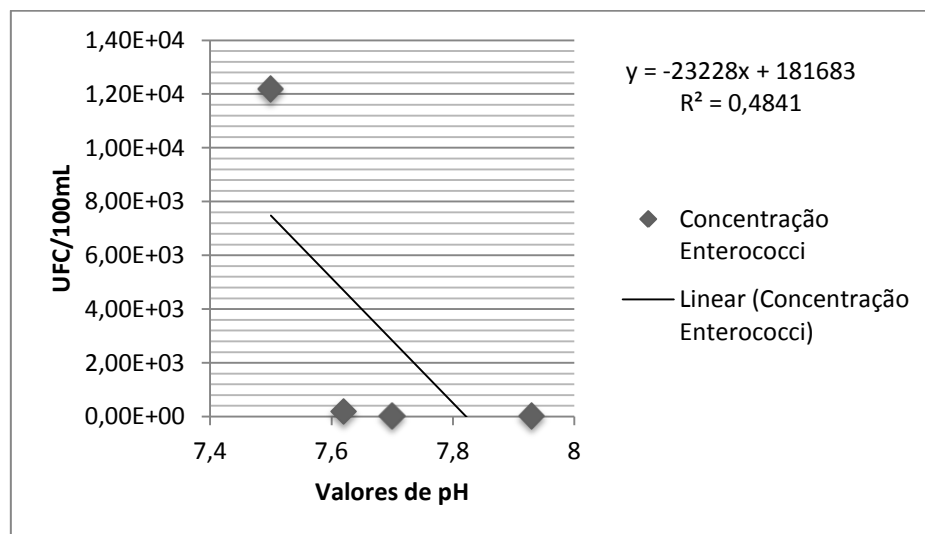
### 3.1.3.1. Freixo

Na análise dos gráficos X a XIII, constatou-se que existe uma relação inversa entre a variável dependente (contagens de microrganismos) e a variável independente (pH). Assim, à medida que a variável pH assumiu valores superiores verificou-se que as contagens de microrganismos nas amostras de água diminuíram. Relativamente aos coeficientes de correlação e determinação ( $R$  e  $R^2$ ), constatou-se a existência de uma relação forte entre as contagens de microrganismos indicadores de contaminação e os valores de pH da água. Para *E. coli* e enterococos verificou-se uma relação entre 67% e 69%. Relativamente aos microrganismos totais (22°C e 37°C) observou-se uma relação na ordem dos 73%.

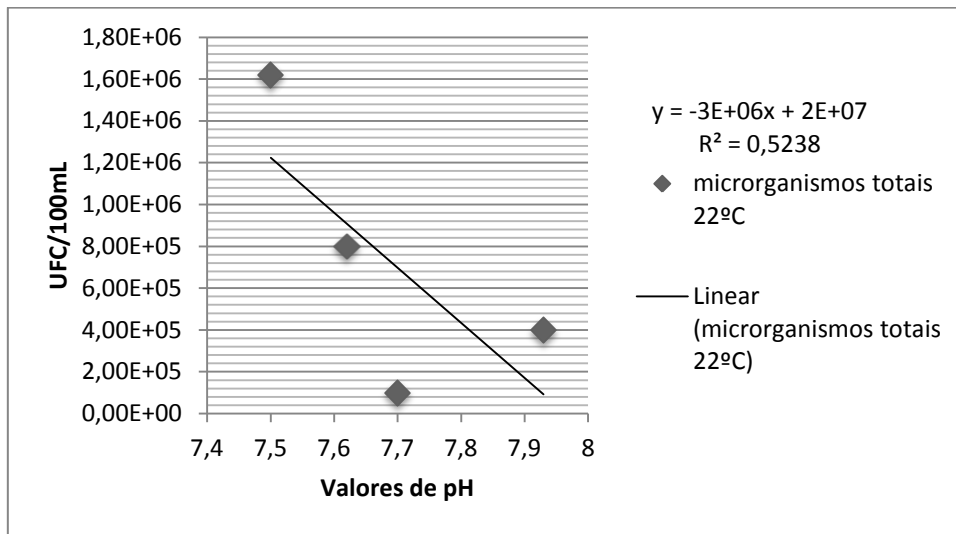
**Gráfico X-** Relação entre as variáveis pH e contagens de *E. coli* no ponto de amostragem Freixo



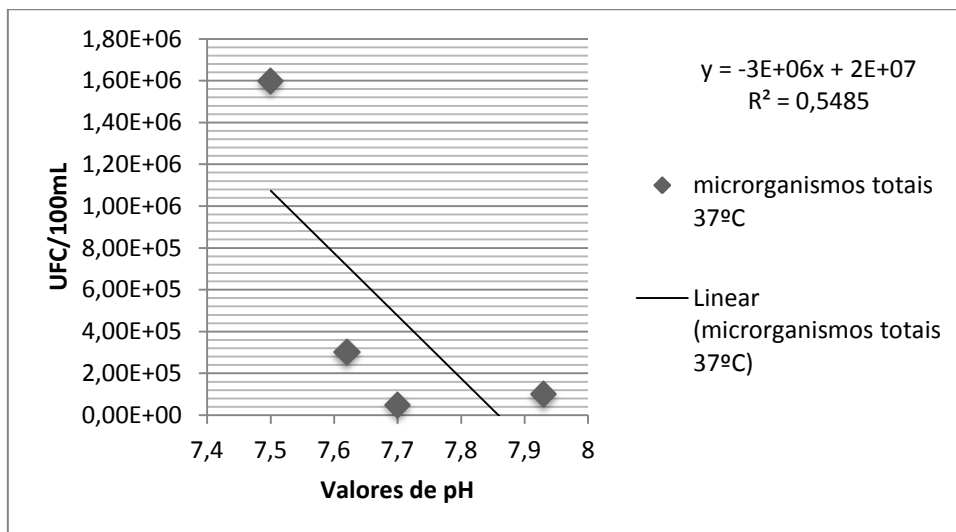
**Gráfico XI-** Relação entre as variáveis pH e contagens de enterococos no ponto de amostragem Freixo



**Gráfico XII-** Relação entre as variáveis pH e contagens de microrganismos totais (22°C) no ponto de amostragem Freixo.



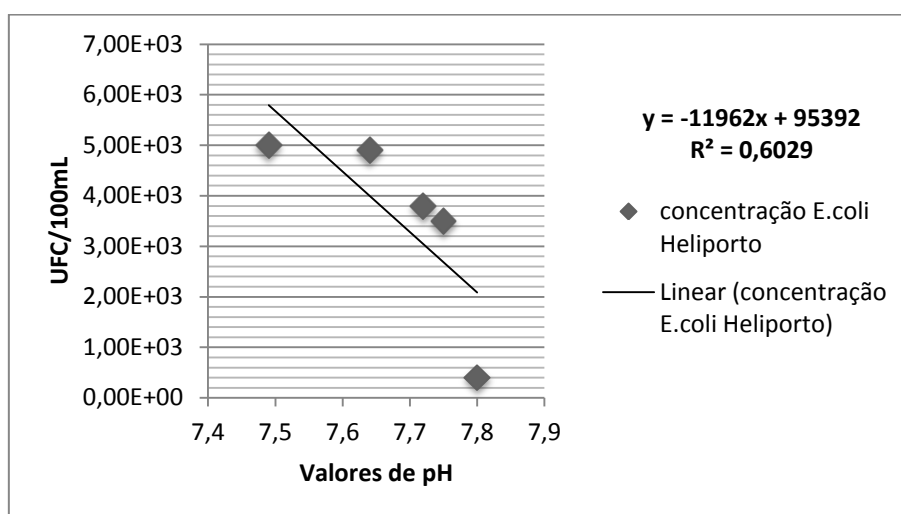
**Gráfico XIII-** Relação entre as variáveis pH e contagens de microrganismos totais (37°C) no ponto de amostragem Freixo.



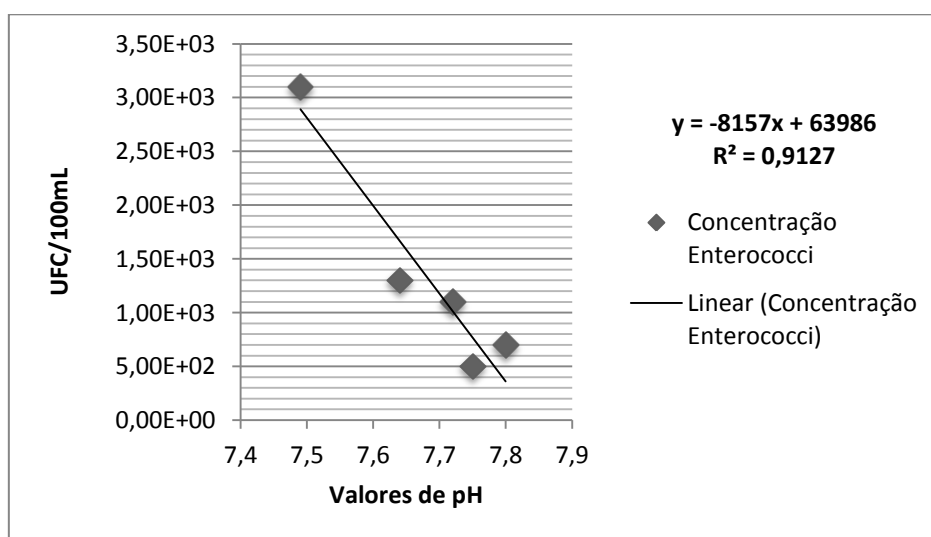
### 3.1.3.2. Heliporto

Os gráficos XIV a XVII expressam a relação entre as contagens de microrganismos obtidas ao longo do período de amostragem no local Heliporto com os valores de pH das amostras de água. Os coeficientes de correlação e determinação (R e R<sup>2</sup>) determinados demonstraram a existência de uma relação muito forte entre os valores dos bioindicadores de contaminação fecal e os valores de pH da água.

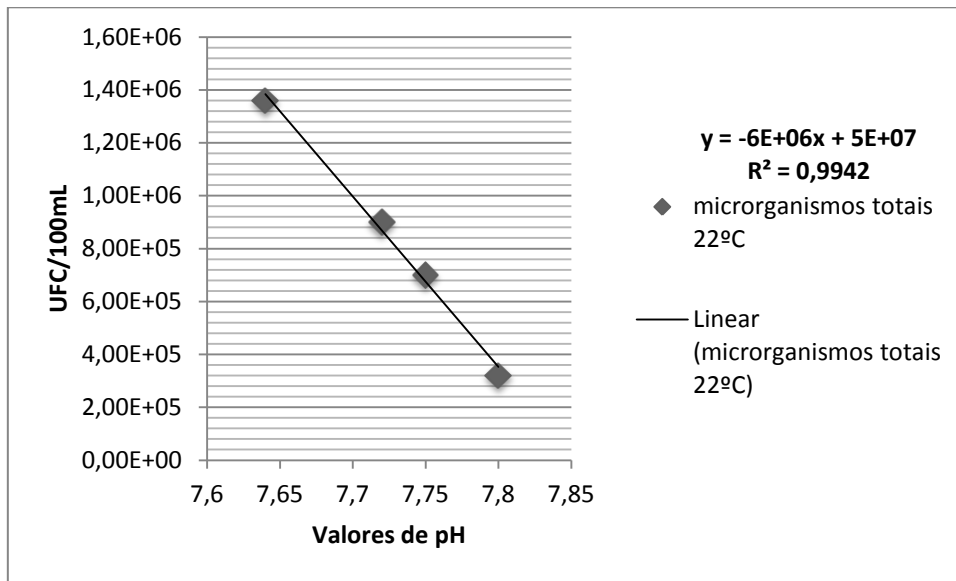
**Gráfico XIV-** Relação entre as variáveis pH e contagens de *E. coli* no ponto de amostragem Heliporto.



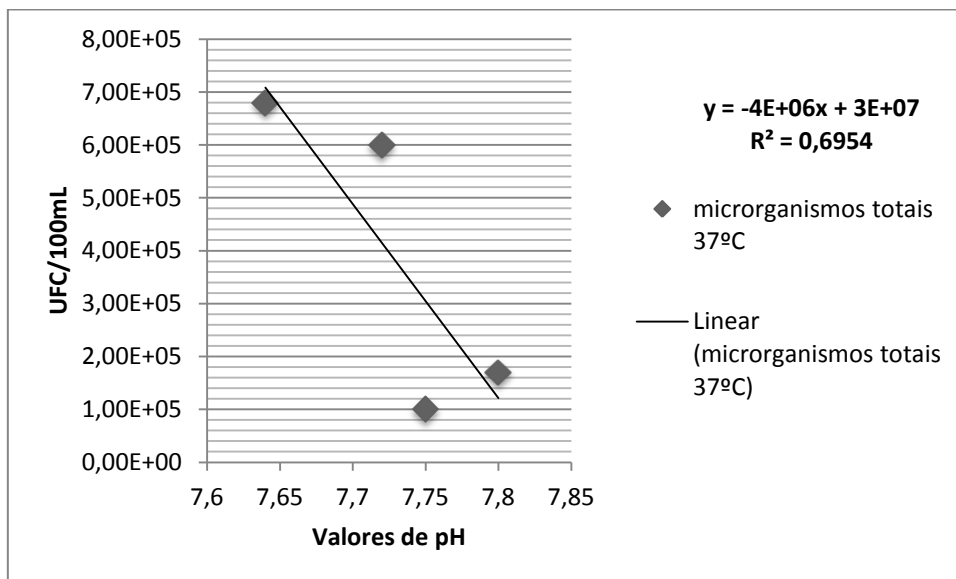
**Gráfico XV-** Relação entre as variáveis pH e contagens de enterococos no ponto de amostragem Heliporto.



**Gráfico XVI-** Relação entre as variáveis pH e contagens de microrganismos totais (22°C) no ponto de amostragem Heliporto.



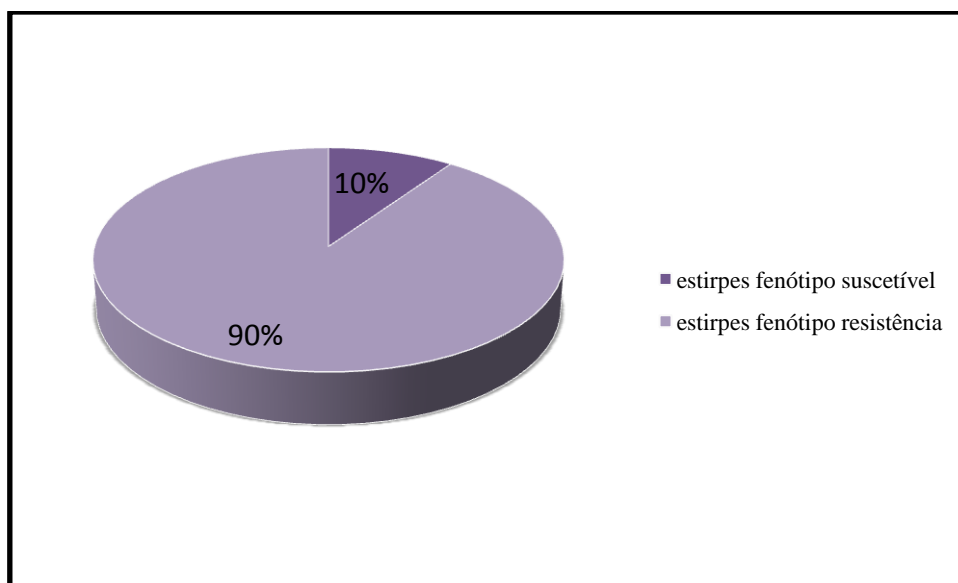
**Gráfico XVII-** Relação entre variáveis pH e contagens de microrganismos totais (37°C) no ponto de amostragem Heliporto.



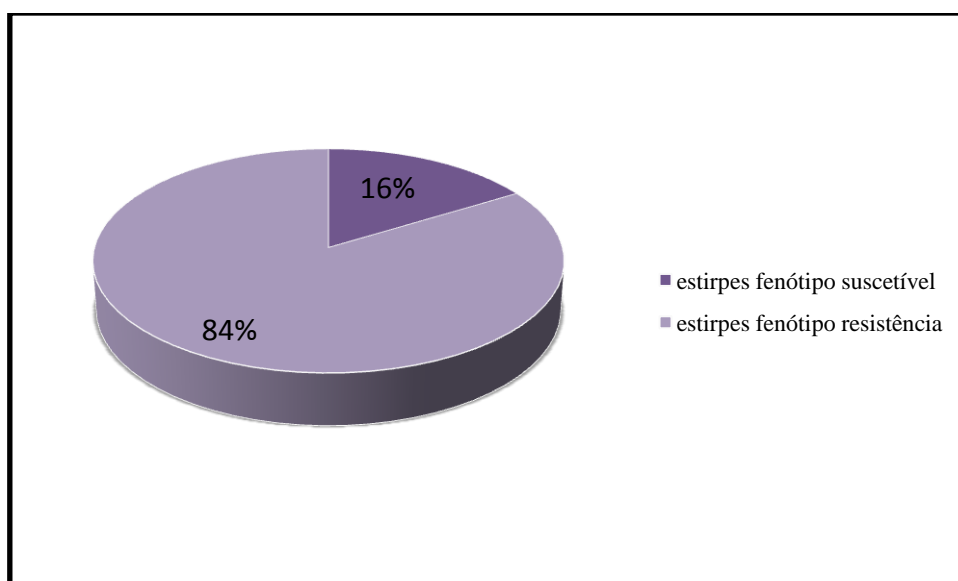
### 3.2. Perfil de suscetibilidade das estirpes de *E. coli* e enterococos aos agentes antimicrobianos

Foram isoladas 62 estirpes de *E.coli* e 49 estirpes de enterococos nas amostras de água do rio Douro e orla costeira. Na análise dos gráficos XVIII e XIX verificou-se que 90,3% (52/62) das estirpes de *E. coli* e 83,7% (41/49) das estirpes de enterococos demonstraram fenómenos de resistência a pelo menos um agente antimicrobiano.

**Gráfico XVIII**-Prevalência de estirpes de *E. coli* com fenótipos de suscetibilidade e de resistência em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto (n=62).



**Gráfico XIX**-Prevalência de estirpes de enterococos com fenótipo de suscetibilidade e de resistência em amostras de águas do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto (n=49).



### 3.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *E.coli*

A suscetibilidade das estirpes de *E. coli* foi avaliada relativamente a classes distintas de antimicrobianos, sendo utilizados no total 19 agentes antimicrobianos de relevo na prática clínica humana e veterinária.

Na análise do Quadro VI, verificou-se que 74,2% (46/62) das estirpes apresentaram resistência à ampicilina. Relativamente aos restantes antimicrobianos beta-lactâmicos verificou-se que 35,5% (22/62) das estirpes apresentaram resistência à cefalotina, 26,8% (16/62) à cefotaxima, 12,9% (8/62) à cefoxitina e 4,84% (3/62) à ceftazidima. Na análise da associação amoxicilina/ácido clavulânico verificou-se a frequência de resistência de 11,3% (7/62). Relativamente ao monobactamo, aztreonamo, apenas uma estirpe expressou resistência a este composto (1,61%).

Verificou-se que 61,3% (38/62) das estirpes apresentou resistência à tetraciclina. A associação trimetoprim/sulfametoxazol apresentou um fenómeno de resistência de 46,8% (29/62). Relativamente às quinolonas e fluoroquinolonas observou-se uma frequência de resistência de 45,5% (28/62) e 35,5% (22/62), respetivamente. Relativamente ao cloranfenicol, constatou-se que as estirpes apresentaram 21,0% (13/62) de resistência a este antimicrobiano.

Na continuação da análise da tabela, e relativamente aos aminoglicosídeos verificou-se que 40,3% (25/62) das estirpes apresentaram fenómenos de resistência à estreptomicina, 11,3% (7/62) à kanamicina, 9,67% (6/62) à gentamicina e 4,84% (3/62) à tobramicina.

Os agentes antimicrobianos nitrofurantoína, imipenemo e amicacina não foram contemplados no Quadro VI, visto que 100% (62/62) das estirpes apresentaram um fenómeno de suscetibilidade antimicrobiana aos mesmos.

**Quadro VI-** Incidência e prevalência de estirpes de *E. coli* com resistência a agentes antimicrobianos em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto (n=62).

Agentes Antimicrobianos	Número e percentagem de estirpes de <i>E.coli</i> distribuídas por local de amostragem				Total n=62
	Freixo n=25	Heliporto n=32	Foz n=2	Matosinhos n=3	
<b>AMP</b>	20 (80,0)	24 (75,0)	0	2 (66,7)	46 (74,2)
<b>FOX</b>	3(12,0)	5 (15,6)	0	0	8 (12,9)
<b>CIP</b>	12(48,0)	9 (28,1)	0	1 (33,3)	22 (35,5)
<b>CN</b>	3 (12,0)	3 (9,4)	0	0	6 (9,67)
<b>TET</b>	15 (60,0)	20 (62,5)	0	3 (100)	38 (61,3)
<b>CTX</b>	7 (28,0)	9 (28,1)	0	0	16 (25,8)
<b>ATM</b>	1 (4,0)	0	0	0	1 (1,61)
<b>CAZ</b>	1 (4,0)	2 (6,3)	0	0	3 (4,84)
<b>AMC</b>	2 (8,0)	5 (15,6)	0	0	7 (11,3)
<b>KF</b>	11(44,0)	11 (34,4)	0	0	22 (35,5)
<b>STR</b>	11(44,0)	13 (40,6)	0	1 (33,3)	25 (40,3)
<b>NA</b>	14 (56,0)	13(40,6)	0	1 (33,3)	28 (45,2)
<b>CHL</b>	6 (24,0)	7 (21,9)	0	0	13 (21,0)
<b>TOB</b>	1 (4,2)	2 (6,9)	0	0	3 (4,84)
<b>SXT</b>	12 (50,0)	17 (58,6)	0	0	29 (46,8)
<b>K</b>	6 (25,0)	1 (3,4)	0	0	7 (11,3)

AMP- Ampicilina; FOX- Cefoxitina; CIP- Ciprofloxacina; CN- Gentamicina; TET- Tetraciclina; CTX- Cefotaxima; ATM- Aztreonamo; CAZ- Ceftazidima; AMC- Amoxicilina/Ácido Clavulânico; KF – Cefalotina; STR- Estreptomicina; NA- Ácido nalidixico; CHL- Cloranfenicol; TOB- Tobramicina; SXT- Trimetoprim/Sulfametoxazol; K- Kanamicina.

### 3.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de enterococos

Na avaliação do perfil de suscetibilidade das estirpes de enterococos em estudo foram testados 12 agentes antimicrobianos pertencentes a classes distintas.

Na análise do Quadro VII, e relativamente aos antimicrobianos da classe dos macrólidos constatou-se um fenómeno de resistência de 40,8% (20/49) e 20,4% (10/49) à azitromicina e eritromicina, respetivamente. Observou-se que 34,7% (17/49) das estirpes manifestaram resistência à rifampicina e 30,6% (15/49) à tetraciclina. Relativamente aos glicopéptidos verificou-se um fenómeno de resistência à vancomicina de 26,5% (13/49) e à teicoplanina de 16,3% (8/49). Na continuação da análise do quadro, verificou-se que 20,4% (10/49) e 16,3% (8/49) das estirpes

manifestaram fenómenos de resistência às fluoroquinolonas e estreptograminas. A resistência à nitrofurantoína e ampicilina foi expressa por 18,4% (9/49) e 10,2% (5/49) das estirpes. Relativamente à gentamicina e cloranfenicol observou-se um fenómeno de resistência de apenas 2,04% (1/49) para ambos.

**Quadro VII-** Incidência e prevalência de estirpes de enterococos com resistência a agentes em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto (n= 49).

Agentes Antimicrobianos	Número e percentagem de estirpes de enterococos distribuídas por local de amostragem				Total n=49
	Freixo n=20	Heliporto n=25	Foz n=1	Matosinhos n=3	
<b>AMP</b>	0	5 (20)	0	0	5 (10,2)
<b>QD</b>	4(20)	3 (12)	0	1 (33,3)	8 (16,3)
<b>TET</b>	6(30)	7 (28)	0	2 (66,6)	15 (30,6)
<b>RD</b>	12 (60)	3 (52)	1(100)	1 (33,3)	17 (34,7)
<b>ERY</b>	2 (20)	8 (32)	0	0	10 (20,4)
<b>CN</b>	1 (5)	0	0	0	1(2,04)
<b>VAN</b>	6 (30)	7(28)	0	0	13 (26,5)
<b>AZM</b>	7 (35)	12 (48)	0	1(33,3)	20 (40,8)
<b>TEC</b>	2 (10)	6 (24)	0	0	8 (16,3)
<b>CHL</b>	1(5)	0	0	0	1 (2,04)
<b>F</b>	3 (15)	5 (20)	0	1 (33,3)	9 (18,4)
<b>CIP</b>	4 (20)	6(24)	0	0	10 (20,4)

AMP- Ampicilina; QD- Quinupristina/Dalfopristina; TET- Tetraciclina; RD- Rifampicina; ERY- Eritromicina; CN- Gentamicina; VAN- Vancomicina; AZM- Azitromicina; TEC- Teicoplanina; CHL- Cloranfenicol; F- Nitrofurantoína; CIP - Ciprofloxacina

### 3.2.3. Fenótipos associados a multirresistência a antimicrobianos

O Quadro VIII expressa a prevalência de estirpes de *E. coli* com fenótipos associados a multirresistência. Da sua análise constatou-se que 56,5% (35/62) manifestou fenómenos de multirresistência a um mínimo de três classes de antimicrobianos distintos. Assim, 33,9% (21/62) das estirpes que apresentaram fenótipos de resistência não associados a multirresistência e 9,7% (6/62) apresentaram suscetibilidade a todos os agentes antimicrobianos testados.

Relativamente ao ponto de amostragem verificou-se que 60,0% (15/25) e 59,4% (19/32) das estirpes isoladas de amostras de água no Freixo e Heliporto expressaram fenótipo de multirresistência a classes distintas de antimicrobianos. Este fenómeno não se observou

nas amostras de água da Praia dos Ingleses e apenas foi expresso por uma estirpe isolada da Praia de Matosinhos.

**Quadro VIII-** Incidência e prevalência de estirpes de *E. coli* com fenótipos associados a multirresistência (MDR) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto.

Local	Estirpes Resistentes		Estirpes suscetíveis	Total
	Fenótipo MDR	Fenótipo não MDR		
Freixo	15	9	1	25
Heliporto	19	10	3	32
Matosinhos	1	2	0	3
Foz	0	0	2	2
<b>Total</b>	35 (56,5%)	21 (33,9%)	6 (9,7%)	62(100%)

O Quadro IX representa o índice de multirresistência (MDR) das estirpes de *E. coli* aos agentes antimicrobianos estudados. Constatou-se que as estirpes isoladas no local Freixo e Heliporto apresentaram um índice de MDR de 0,26 e 0,23, respetivamente. Nas amostras de Matosinhos estes resultados foram de 0,14 e na Foz foram nulos.

**Quadro IX-** Índice de multirresistência em estirpes de *E. coli* aos agentes antimicrobianos (MDR).

MDR	Local de amostragem			
	Freixo	Heliporto	Foz	Matosinhos
	0,26	0,23	0	0,14

No presente estudo constatou-se que as estirpes de *E. coli* apresentaram fenómenos de MDR a um máximo de 11 e 14 agentes antimicrobianos em simultâneo pertencentes às classes beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, fenicois, tetraciclina e inibidores da via folato. Relativamente aos antimicrobianos beta-lactâmicos verificou-se

associação de resistência ao grupo das penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de 1ª e 3ª geração e inibidores de beta-lactamases e aztreonamo.

Na análise do Quadro X constatou-se que 36,7,% (18/49) das estirpes de enterococos manifestaram fenómenos de multirresistência a um mínimo de três agentes antimicrobianos pertencentes a classes distintas. Verificou-se que 46,9% (23/49) das estirpes que expressaram resistência não estavam associadas a multirresistência.

Na continuação da análise do quadro observou-se que as estirpes isoladas no ponto de amostragem Heliporto apresentaram um fenómeno de multirresistência de 44,0% (11/25). Observou-se que no Freixo, 35,0% (7/20) das estirpes apresentaram multirresistência. Nos restantes locais constatou-se que as estirpes não manifestaram este fenómeno.

**Quadro X-** Incidência e prevalência de estirpes de enterococos com fenótipo associado a multirresistência (MDR) em amostras de água do rio Douro e orla costeira da cidade do Porto.

Local	Estirpes resistentes		Estirpes suscetíveis	Total
	Fenótipo MDR	Fenótipo não MDR		
<b>Freixo</b>	7	11	2	20
<b>Heliporto</b>	11	8	6	25
<b>Matosinhos</b>	0	3	0	3
<b>Foz</b>	0	1	0	1
<b>Total</b>	18 (36,7%)	23 (46,9%)	8(16,3%)	49(100%)

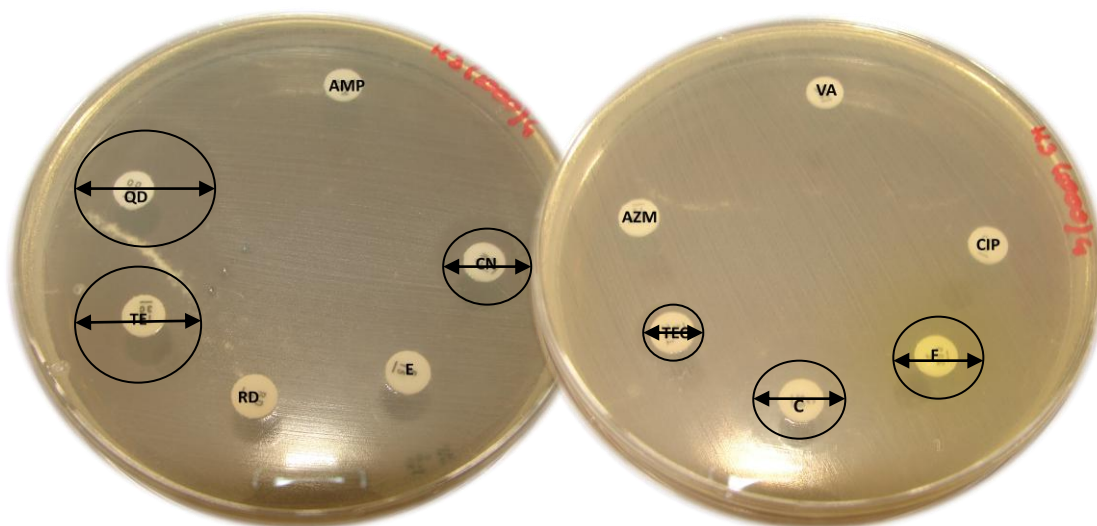
Na análise do quadro XI verificou-se que o índice de resistência referente às estirpes de enterococos no ponto de amostragem Heliporto apresentou valores superiores aos do Freixo. Relativamente ao ponto de amostragem em Matosinhos este apresentou um índice de MDR de 0,17 e na Foz de 0,08.

**Quadro XI-** Índice de multirresistência em estirpes de enterococos aos agentes antimicrobianos (MDR).

MDR	Local de amostragem			
	Freixo	Heliporto	Foz	Matosinhos
	0,20	0,24	0,08	0,17

No presente estudo verificou-se que as estirpes de enterococos apresentaram fenômenos de MDR a um máximo de oito agentes antimicrobianos pertencentes às classes beta-lactâmicos, rifampicina, macrólidos, glicopéptidos, nitrofuranos e fluoroquinolonas.

Verificou-se que 26,5% (13/49) das estirpes expressaram fenótipo VRE, das quais 61,5% (8/13) expressaram fenótipo VanA e 38,5% (5/13) manifestaram fenótipo VanB. Observou-se que as estirpes VRE demonstraram altos níveis de multirresistência à ampicilina (n=5), rifampicina (n=8), tetraciclina (n=3), eritromicina (n=6), azitromicina (n=7), ciprofloxacina (n=6), nitrofurantoína (n= 1) e cloranfenicol (n=2).



**Ilustração XX-** Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de uma estirpe de *E. faecium* (H34/100) pelo método de Kirby-Bauer. Esta estirpe VRE expressa fenótipo VanA e resistência à ampicilina (AMP), rifampicina (RD), eritromicina (E), azitromicina (AZM) e ciprofloxacina (CIP)



# **Capítulo IV**

## **Discussão**

## **Capítulo IV**

<b>4. Discussão.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1. Incidência de estirpes bacterianas em amostras de água do rio Douro e orla costeira</b>	<b>85</b>
<b>4.2. Perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos</b>	<b>87</b>
4.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de <i>E. coli</i>	88
4.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de enterococos	92
4.2.3. Fenótipos associados a multirresistência a antimicrobianos	94

## 4. Discussão

### 4.1. Incidência de estirpes bacterianas em amostras de água do rio Douro e orla costeira

O estuário do Douro é altamente poluído devido à urbanização, industrialização, efluência de pequenos rios, descargas de esgotos diretamente na água bem como de efluentes provenientes de ETARs localizadas nas suas imediações (Azevedo *et al.*, 2010; Madureira *et al.*, 2010). As praias são locais sujeitos a elevadas pressões antropogénicas resultantes da afluência populacional e atividades recreativas (Oliveira and Pinhata, 2008). Os microrganismos *E. coli* e enterococos são bioindicadores de contaminação fecal utilizados na monitorização da qualidade da água.

Neste estudo as amostragens foram realizadas durante a manhã, período durante o qual estudos de Bordalo (2003) demonstraram uma maior descarga de efluentes de esgotos no estuário.

Na análise dos valores médios de estirpes bacterianas verificou-se que estas foram mais elevadas nas amostras do estuário do Douro em comparação com as amostras da orla costeira. Estes resultados corroboram estudos de Janelidze e colaboradores (2011) que descreveram diferenças significativas entre as contagens de microrganismos em estuários e zonas costeiras. Estudos de Madureira e colaboradores (2010) demonstraram que o estuário do Rio Douro possui parâmetros físico-químicos como temperatura e salinidade moderadas, fatores que proporcionam condições favoráveis à multiplicação e persistência dos microrganismos estudados.

Constatou-se que as estirpes de *E. coli* e enterococos apresentaram os valores mais elevados no ponto de amostragem Freixo ( $6,03 \times 10^3$  e  $3,11 \times 10^3$  UFC/100mL) em comparação com o Heliporto ( $3,52 \times 10^3$  e  $1,34 \times 10^3$  UFC/100mL). A montante do Freixo encontra-se localizada a ETAR do Freixo, estudos evidenciaram que tratamentos de águas residuais ineficientes promovem a disseminação de microrganismo no ambiente aquático, bem como de genes de resistência a antimicrobianos (Rahube and Yost, 2010; Figueira *et al.*, 2011).

Constatou-se que os valores médios de microrganismos a 22°C e a 37°C estiveram compreendidos entre  $7,30 \times 10^5$  e  $8,20 \times 10^5$  UFC/100mL e 4,88 e  $5,13 \times 10^5$ , resultados que podem sugerir a contaminação da água por matéria orgânica.

Relativamente às estirpes de *E. coli* com fenótipo de resistência à ampicilina e cefotaxima e estirpes VRE verificou-se que os seus valores médios foram superiores em amostras de água do ponto de amostragem Heliporto. Como referem vários autores (Novais *et al.*, 2005; Madureira *et al.*, 2010) o rio Douro é altamente contaminado por efluentes de origem hospitalar. O grupo das penicilinas e cefalosporinas são predominantemente administrados em ambiente hospitalar (Kümmerer, 2009a) e os processos convencionais de tratamento de águas residuais não são totalmente eficazes na remoção ou degradação de agentes antimicrobianos (Madureira *et al.*, 2010). Estirpes de VRE foram detetadas em amostras de efluentes de hospitais, bem como em amostras de água do estuário do rio Douro (Novais *et al.*, 2005). O médio estuário é uma área altamente influenciada por pressões antropogénicas e alvo de contaminação por diversas fontes (Azevedo *et al.*, 2008). As estirpes de *E. coli* com resistência à ciprofloxacina foram superiores no ponto de amostragem Freixo. A montante deste local encontra-se localizada a ETAR do Freixo. Estudos de Figueira e colaboradores (2011) relataram o aumento significativo de resistência à ciprofloxacina em *E. coli* associado ao tratamento de efluentes urbanos em ETARs.

O pH é um parâmetro importante e verificou-se a sua influência na abundância de microrganismos. Observou-se uma relação inversa entre as contagens de bioindicadores e o valor de pH das águas. A correlação entre as duas variáveis foi muito forte em ambos os pontos de amostragem com níveis de associação acima dos 65%.

Na análise das contagens das estirpes de *E. coli* e enterococos ao longo do período de amostragem verificou-se que estas apresentaram-se os valores mais elevados nos meses de Primavera em comparação com o Verão. Estes resultados corroboram estudos de Okeke e colaboradores (2011). Estes resultados podem estar associados a períodos pluviométricos de grande intensidade que tiveram lugar ao longo desses meses. Existem evidências que as concentrações de bioindicadores aumentam durante períodos de pluviosidade acentuada devido principalmente ao arrastamento massivo de microrganismos (incluindo os fecais) a partir dos solos e superfícies urbanizadas (Lipp, 2001; Janelidze *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011).

Na análise dos valores paramétricos microbiológicos de referência para avaliação e classificação das águas balneares estipulados pelo Decreto-lei nº107 de 2009, constatou-se que o valor de percentil 95 para as contagens microbiológicas no ponto de amostragem Freixo foram inferiores aos valores de “qualidade boa”. A amostra recolhida em Abril não foi considerada, visto que os valores microbiológicos detetados nesse período podem advir de um episódio de poluição de curta duração que não se verificou novamente durante o período de avaliação. Nesse mês observou-se que as contagens foram muito superiores aos valores microbiológicos de referência. Relativamente às amostras de água do ponto de amostragem Heliporto, os valores dos parâmetros microbiológicos apresentaram valores muito superiores aos de referência na legislação vigente (com base na avaliação do percentil 90, acima de 900 e 330 ufc/100mL para *E. coli* e enterococos, respetivamente), pelo que durante o período de amostragem estas águas podem ser classificadas como de má qualidade. De acordo com a norma de qualidade para as águas costeiras, verificou-se que as contagens microbiológicas detetadas nas amostras de água da praia dos Ingleses e Matosinhos apresentaram valores correspondentes aos padrões estabelecidos na classificação de “qualidade excelente” das águas balneares.

#### **4.2. Perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos**

Os antimicrobianos são utilizados na medicina humana e animal para o tratamento de doenças infecciosas provocadas por agentes patogénicos. A presença de *E. coli* e enterococos em ambientes aquáticos é um problema de saúde pública, em virtude das implicações que possa ter a segurança das atividades de recreio, na rega de vegetais ou no tratamento de água para consumo humano. Contudo, a existência de poucos estudos e da variabilidade de agentes antimicrobianos testados tornou a comparação da prevalência de resistência antimicrobiana num desafio.

Constatou-se que 90,3% (56/62) das estirpes de *E. coli* apresentaram fenótipo de resistência a pelo menos um agente antimicrobiano. Os valores percentuais de resistência apresentados por Servais and Passerat em isolados do rio Sena foram mais baixos. No entanto a alta prevalência de resistência em estirpes de *E. coli* corrobora estudos de Moore e colaboradores (2010) e Florea (2011). Relativamente aos enterococos verificou-se que 83,7% (41/49) das estirpes manifestaram fenótipo de

resistência. Estes resultados corroboram os valores percentuais definidos em ambientes aquáticos (Servais and Passerat, 2009).

Na análise dos perfis de suscetibilidade antimicrobiana observou-se a existência de variabilidade fenotípica entre as estirpes de *E. coli* isoladas, fenómeno também observado nas estirpes de enterococos. De acordo com Okeke e colaboradores (2011), estes resultados podem inferir quanto à proveniência das estirpes de fontes de contaminação distintas, bem como quanto à sua origem e linhagem filogenética (Figueira *et al.*, 2011).

#### 4.2.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de *E. coli*

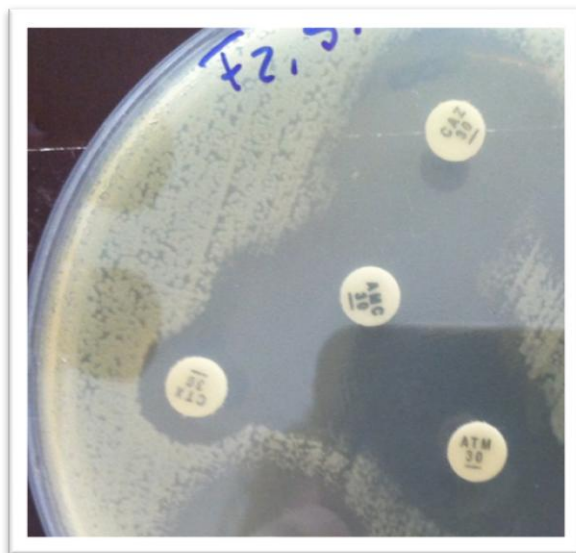
A análise do perfil de suscetibilidade das estirpes de *E. coli* contemplou 19 agentes antimicrobianos pertencentes a sete classes distintas designadamente: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclinas, nitrofuranos, fenicois e inibidores da via folato.

No presente estudo constatou-se que 74,2% (46/62) e 45,2% (28/62) das estirpes manifestaram um fenómeno de resistência à ampicilina e ácido nalidixico, respetivamente. Estes valores percentuais aproximam-se dos resultados obtidos em estudos de Florea em 2011 (80,0% de resistência à ampicilina e 40,0% de resistência ao ácido nalidixico). Relativamente à ampicilina o resultado obtido no presente estudo foi descrito em outros estudos realizados em Portugal (Henriques *et al.*, 2006). No entanto, em estudos de Servais e Passerat (2009) foi evidenciada uma menor frequência de resistência à classe das quinolonas (4% de resistência ao ácido nalidixico). As quinolonas foram introduzidas posteriormente aos beta-lactâmicos (Aminov and Mackie, 2007) e a sua utilização na aquacultura e produção pecuária como agente profilático foi banida em vários países industrializados (Martinez, 2009). Todavia, continuam a ser muito utilizadas em Portugal, quer pela população humana (o terceiro antimicrobiano mais prescrito), quer na clínica de animais de companhia e de produção (5644Kg no ano de 2010). De acordo com o *European Surveillance of Antimicrobial Consumption* (ESAC) as penicilinas e quinolonas representam 51% e 14% da utilização total de antimicrobianos em Portugal (ESAC, 2009).

No presente estudo observou-se um fenômeno de resistência em 35,5% (22/62) das estirpes à cefalotina. A resistência ao grupo das penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração é conferida por mecanismos de resistência idênticos, contudo no presente estudo o valor percentual de resistência à cefalotina apresentou-se inferior aos descritos por Henriques e colaboradores em 2006 (63% de resistência) e Koczura em 2012 (88,9% de resistência). Aos agentes antimicrobianos cefotaxima e ceftazidima pertencentes à classe das cefalosporinas de 3ª geração, constatou-se uma frequência de resistência de 26,8% (16/62) e 4,84% (3/62), respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os descritos por Servais and Passerat (2009), Henriques e colaboradores (2006) e Koczura e colaboradores (2012). Ao agente antimicrobiano cefotaxima pertencente à classe das cefamicinas verificou-se um fenômeno de resistência em 12,9% (8/62) das estirpes. Este valor percentual apresentou-se inferior aos resultados descritos em isolados clínicos por Hussain e colaboradores em 2011 (40,0% de resistência à cefoxitina). No entanto, o presente estudo corrobora a frequência de resistência descrita por Moore e colaboradores em isolados ambientais. A combinação amoxicilina/ácido clavulânico apresentou uma frequência de resistência de 11,3% (7/62). O resultado obtido no presente estudo apresentou-se inferior do que o definido por Koczura e colaboradores em 2012 (57,8% de resistência). No entanto, corrobora os resultados descritos por Henriques e colaboradores (2006) e Servais and Passerat (2009). O monobactamo aztreonam apresentou uma frequência de resistência de 1,61% (1/62). Este valor percentual apresentou-se inferior do que os resultados obtidos em isolados clínicos por Koczura e colaboradores (2012). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo aproximam-se dos descritos por Henriques e colaboradores (2006) Moore e colaboradores (2010) e Koczura e colaboradores (2012) em isolados ambientais aquáticos. Ao imipenem pertencente à classe dos carbapenemos observou-se que 100% (62/62) das estirpes manifestaram fenótipo de suscetibilidade. O resultado obtido corrobora a literatura revista (Henriques *et al.*, 2006; Hussain *et al.*, 2011; Falcone- Dias *et al.*, 2012), o que demonstra que a resistência a este agente antimicrobiano de última estância não se encontra disseminada.

As ESBLs são caracterizadas pela sua atividade hidrolítica contra cefalosporinas de 3ª geração e monobactamos. Diferem das beta-lactamases da classe C de Ambler, pela suscetibilidade ao ácido clavulânico e incapacidade de hidrólise de agentes antimicrobianos da classe das cefamicinas (Bush and Fisher, 2011). Na detecção destas

enzimas são utilizadas várias metodologias, como o método de difusão em disco aplicado no presente estudo. Deste modo, para a detecção de ESBLs colocou-se um disco da combinação amoxicilina/ácido clavulânico entre os discos de cefotaxima e ceftazidima. O aumento da zona de inibição das cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração provocado pela ação sinérgica da combinação de amoxicilina/ácido clavulânico traduz-se num resultado positivo (Ilustração XXI).



**Ilustração XXI-** Método de difusão em disco e detecção de ESBLs. Disco de amoxicilina/ácido clavulânico entre os discos de cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ).

No entanto, a identificação fenotípica e diferenciação de ESBLs e enzimas AmpC pelo teste de suscetibilidade antimicrobiana pode dar origem a falsas interpretações. Uma estirpe produtora de enzimas AmpC mediadas por plasmídeo pode possuir a capacidade de co-produção de outras beta-lactamases como as ESBLs (Jacoby, 2009; Corvec *et al.*, 2010). A interferência de outras beta-lactamases produzidas pela mesma estirpe bacteriana pode interferir igualmente na distinção fenotípica do tipo de ESBLs expressas (Pitout *et al.*, 2004). A resistência à cefoxitina e a cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração pode inferir quanto à resistência mediada por enzimas AmpC, contudo este fenótipo não é exclusivo deste tipo de beta-lactamases, uma vez que algumas carbapenemases e beta-lactamases pertencentes à classe A de Ambler possuem atividade hidrolítica contra estas classes de agentes antimicrobianos (Jacoby, 2009). Acresce que a resistência à cefoxitina pode advir de mecanismos de resistência bioquímicos como redução da permeabilidade membranar (Hanson, 2003).

Relativamente à tetraciclina observou-se uma alta taxa de frequência de resistência (61,3%). O resultado obtido quanto a este agente antimicrobiano corrobora estudos de realizados por Henriques e colaboradores (2006), Moore e colaboradores (2011) e Koczura e colaboradores (2012). Este antimicrobiano foi utilizado extensivamente na aquacultura como promotor de crescimento e agente profilático em concentrações sub-inibitórias (Barros *et al.*, 2011).

As estirpes de *E. coli* apresentaram um fenómeno de resistência à associação de trimetoprim/sulfametoxazol de 46,8% (29/62). A alta frequência de resistência observada a esta associação corrobora os resultados apontados por estudos de Henriques e colaboradores (2006), Servais and Passerat (2009) e Koczura e colaboradores (2012). Em estudos de Madureira e colaboradores (2010) foram detetadas concentrações deste agente antimicrobiano nas águas do Rio Douro. Estes compostos não são degradados eficazmente pelos tratamentos aplicados nas ETARs e provêm essencialmente de efluentes urbanos e hospitalares que desaguam diretamente ou indiretamente nas águas do rio. Os resultados descritos podem influenciar a resistência antimicrobiana a este agente. Adicionalmente as ETARs promovem e facilitam a transferência de resistência entre bactérias (Baquero *et al.*, 2008; Rahube and Yost, 2010).

Relativamente às fluoroquinolonas observou-se que 35,5% (22/62) das estirpes manifestaram um fenómeno de resistência à ciprofloxacina. Este valor percentual apresentou-se inferior do que os resultados definidos em amostras ambientais de *E. coli* por Koczura e colaboradores (2012).

Na classe dos aminoglicosídeos verificou-se um fenómeno de resistência em 40,3% (25/62) das estirpes à estreptomicina. Estudos de Florea (2011) e Figueira e colaboradores (2011) evidenciaram um valor percentual inferior de resistência a este antimicrobiano. Aos agentes antimicrobianos tobramicina e gentamicina observaram-se baixas frequências de resistência, 4,84% (3/62) e 9,67% (6/62), respetivamente. Em estudos realizados por Moore e colaboradores (2010) foram descritas taxas superiores de resistência a estes compostos. Contudo, os resultados do presente estudo corroboram estudos desenvolvidos por Henriques e colaboradores em 2006 (8,0% de resistência à tobramicina e 10% de resistência à gentamicina). Ao agente antimicrobiano kanamicina constatou-se uma frequência de resistência de 11,3% (7/62). Este valor percentual apresentou-se inferior ao descrito por Koczura e colaboradores (2012). Relativamente à

amicacina observou-se um fenómeno de 100% de suscetibilidade das estirpes de *E. coli* a este antimicrobiano. A frequência de resistência a este agente da classe dos aminoglicosídeos apresentou-se inferior à descrita por Moore e colaboradores em 2010 (21,4% de resistência). Contudo, o resultado obtido quanto a este antimicrobiano corrobora os resultados obtidos por Servais and Passerat (2009) e Falcone-Diaz e colaboradores (2012).

Ao agente antimicrobiano cloranfenicol verificou-se o fenómeno de resistência em 21,0% (13/62) das estirpes. Este valor percentual parece aproximar-se dos resultados obtidos em estudos de Koczura e colaboradores (2011) que descreve uma frequência média de resistência ao cloranfenicol. Relativamente à nitrofurantoína verificou-se uma alta frequência de suscetibilidade em 100% das estirpes. O valor percentual de resistência foi inferior ao descrito por Koczura e colaboradores (2012). No entanto o resultado obtido corrobora estudos de Okeke e colaboradores (2011).

#### 4.2.2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das estirpes de enterococos

A suscetibilidade das estirpes de enterococos foi testada relativamente a 12 agentes antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, glicopéptidos, macrólidos, estreptograminas, rifampicina, furanos, aminoglicosídeos e fenicois. Verificou-se que os isolados apresentaram níveis distintos de resistência aos diferentes agentes antimicrobianos testados.

Relativamente à rifampicina verificou-se uma predominância de resistência das estirpes de enterococos. O resultado obtido quanto a este antimicrobiano corrobora estudos de Oliveira and Pinhata (2008).

Ao agente antimicrobiano tetraciclina verificou-se um fenómeno de resistência em 30,6% (15/49) das estirpes. Este valor percentual apresenta-se inferior do que o definido por Freitas e colaboradores em 2011 (70% de resistência à tetraciclina). No entanto, o resultado obtido corrobora estudos de Silva e colaboradores (2006) e Servais and Passerat (2009).

Os glicopéptidos testados foram a vancomicina e teicoplanina sendo que 26,5% (13/49) e 16,3% (8/49) das estirpes manifestaram um fenómeno de resistência, respetivamente.

Os valores percentuais apresentaram-se superiores aos definidos em vários estudos (Servais and Passerat, 2009; Barros *et al.*, 2011; Macedo *et al.*, 2011) e inferiores aos descritos por Novais e colaboradores em 2005. No entanto, os resultados obtidos corroboram estudos de Messi e colaboradores (2006) e Freitas e colaboradores (2011).

Relativamente ao agente antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos, observou-se uma frequência de resistência em 10,2% (5/49) das estirpes. O resultado obtido corrobora estudos de Messi e colaboradores (2006) e Barros e colaboradores (2011).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a baixas concentrações de gentamicina, contudo verificou-se um fenótipo de suscetibilidade a este agente antimicrobiano na maioria das estirpes. A frequência de resistência à gentamicina apresentou-se inferior aos resultados obtidos por Novais e colaboradores em 2005 e Messi e colaboradores em 2006. No entanto, o resultado obtido no presente estudo corrobora os apontados por outros estudos (Oliveira and Pinhata, 2008; Barros *et al.*, 2011; Servais and Passerat 2009).

Relativamente aos agentes antimicrobianos da classe macrólidos verificou-se um fenómeno de resistência em 40,8% (20/49) das estirpes à azitromicina e em 20,6% (10/49) à eritromicina. Quanto ao quinupristina/dalfopristina, pertencente à classe das estreptograminas, observou-se uma frequência de resistência de 16,3% (8/49). De acordo com o ESAC (2009) estes antimicrobianos constituem 17% da utilização total de antimicrobianos em Portugal. Estes valores percentuais de resistência apresentaram-se inferiores aos descritos em estudos de Macedo e colaboradores em 2011 (57% de resistência à eritromicina e 50% de resistência ao quinupristina/dalfopristina). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os descritos por Oliveira and Pinhata em 2008 e Barros e colaboradores em 2011. Relativamente à azitromicina verificou-se uma grande dificuldade em correlacionar os resultados encontrados com outros estudos, visto que este antimicrobiano não é frequentemente alvo de estudo. No entanto, a elevada frequência de resistência a este antimicrobiano seria expectável em virtude da azitromicina ser o segundo princípio ativo mais prescrito em ambulatório no nosso país, sobretudo para o tratamento de constipações sazonais.

Aos agentes antimicrobianos pertencentes à classe das fluoroquinolonas e nitrofuranos, observou-se um fenómeno de resistência em 20,4% (10/49) e 18,3% (9/49) das estirpes, respetivamente. Os valores percentuais apresentaram-se inferiores aos descritos por

Novais e colaboradores em 2005 (56% de resistência à ciprofloxacina e 39% de resistência à nitrofurantoína). Contudo, os resultados obtidos no presente estudo aproximam-se dos resultados descritos por Silva e colaboradores em 2006 (16,1% de resistência à ciprofloxacina) e Macedo e colaboradores em 2011 (20,0% de resistência à nitrofurantoína).

As estirpes manifestaram uma frequência de resistência ao cloranfenicol de 2,04% (1/49). O resultado obtido corrobora a literatura revista (Novais *et al.*, 2005; Servais and Passerat, 2009; Barros *et al.*, 2011; Macedo *et al.*, 2011).

#### 4.2.3. Fenótipos associados a multirresistência a antimicrobianos

No presente estudo constatou-se uma predominância de 56,5% (35/62) de estirpes de *E. coli* que manifestaram um fenómeno de multirresistência a um mínimo de três classes de antimicrobianos. O valor percentual obtido apresentou-se inferior aos resultados descritos em estudos de Moore e colaboradores (2010) e Florea (2011). No entanto, o presente estudo corrobora os resultados descritos por Servais and Passerat (2009). Relativamente aos enterococos observou-se uma frequência fenótipos associados a multirresistência em 36,7% (18/49) das estirpes. O resultado obtido apresentou-se inferior aos descritos por Freitas e colaboradores (2011). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo corroboram os apontados por Servais and Passerat (2009).

O índice de multirresistência a antimicrobianos foi determinado de acordo com Krumperman (1983) para cada ponto de amostragem. No presente estudo, verificou-se que este foi superior nas amostras de água do estuário do rio Douro. Deste modo os valores obtidos no Freixo para *E. coli* e enterococos apresentavam-se na ordem dos 0,26 e 0,20. No Heliporto, verificou-se um índice de MDR em *E. coli* e enterococos de 0,23 e 0,24, respetivamente. Na Praia dos Ingleses os valores determinados foram nulos. Relativamente à praia de Matosinhos o índice de MDR para *E. coli* e enterococos foi de 0,14 e 0,17, respetivamente.

A comparação dos resultados obtidos com a literatura revista revelou-se problemática, uma vez que o índice de MDR depende dos agentes antimicrobianos testados.

Os valores de índice de MDR em *E. coli* apresentaram-se inferiores aos determinados por Florea (2011). No entanto, os resultados obtidos no presente estudo aproximam-se dos descritos por Servais and Passerat (2009), em efluentes hospitalares.

Relativamente ao índice MDR, considera-se que um valor superior a 0,20 é indicativo de um local associado a um alto risco de contaminação e incidência de agentes antimicrobianos. Verificou-se que no Freixo e Heliporto os indicadores de contaminação fecal apresentavam uma alta prevalência de resistência e multirresistência a antimicrobianos, o que pode advir da efluência de resíduos hospitalares e urbanos no estuário do Douro.

No presente estudo constatou-se que as estirpes de *E. coli* apresentaram um fenómeno de MDR a um máximo de 11 e 14 agentes antimicrobianos em pertencentes às classes beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, fenicois, tetraciclina e inibidores da via folato. Estudos de Koczura e colaboradores (2012) descreveram uma média de resistência de 5 a 7 classes de agentes antimicrobianos, em estirpes de *E. coli* provenientes de águas de rio. Os genes de resistência a estas classes de antimicrobianos são frequentemente codificados em plasmídeos e integroes classe 1, elementos associados a fenómenos de multirresistência (Bush and Fisher, 2011; Poirel *et al.*, 2012). No entanto, a escassez de dados moleculares não permite inferir quanto aos mecanismos bioquímicos associados aos fenómenos de resistência e multirresistência aos agentes antimicrobianos estudados.



# **Conclusão e perspectivas futuras**

## Conclusão e perspectivas futuras

A introdução de agentes antimicrobianos no combate a doenças infecciosas foi momento revolucionário na medicina humana. A utilização massiva de antimicrobianos origina pressões seletivas que favorecem a seleção de estirpes com fenótipo de resistência. Os mecanismos de transferência genética possibilitam a rápida disseminação de genes de resistência entre bactérias o que se traduz num importante problema para a saúde pública.

O meio ambiente é constantemente alvo de contaminação por efluentes constituídos por moléculas de antimicrobianos, estirpes bacterianas resistentes, bem como genes de resistência (Silveira *et al.*, 2009). É um importante reservatório de genes de resistência que podem ser captados por patogénicos humanos e animais. Estes microrganismos podem em última estância causar infeção através da ingestão de água e alimentos contaminados.

No presente foram isoladas 62 estirpes de *E. coli* e 49 estirpes de enterococos. Verificou-se uma frequência de resistência e multirresistência em 90,3% (56/62) e 56,5% (35/62) das estirpes de *E. coli*. Os enterococos manifestaram um fenómeno de resistência de 83,7% (41/49) e observou-se um fenótipo de multirresistência em 36,7% (18/49) dos isolados. Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura revista em como os meios ambientes aquáticos constituem importantes reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos. A deteção de enterococos que manifestavam um fenómeno de resistência a antimicrobianos, inclusivamente estirpes VRE, no estuário do rio Douro foi descrita por Novais e colaboradores em 2005. A presença de microrganismos indicadores de contaminação, que expressam um fenómeno de resistência a antimicrobianos, é indicativa da contaminação da água por matéria fecal proveniente de fontes antropogénicas urbanas e hospitalares.

A impossibilidade de inferir quanto à prevalência e tipologia de ESBLs e AmpC detetadas fenotipicamente foi a principal limitação encontrada. De momento o estudo encontra-se na fase de extração de DNA total de *E. coli* e a técnica de amplificação dos genes *bla*, nomeadamente os ensaios de PCR multiplex, encontra-se em fase de otimização. Acresce que as experiências de transconjugação ainda se encontram em fase

de desenvolvimento. Esta técnica é de elevado relevo, uma vez que permite inferir quanto à capacidade de transferência de genes de resistência aos agentes antimicrobianos testados. Este processo em meio aquático é extremamente importante na disseminação e aquisição de resistência quer em bactérias comensais, quer em microrganismos patogênicos.

Atualmente a solução para a problemática de resistência a antimicrobianos não está na síntese de novos fármacos, nem modificação dos pré-existentes, mas sim na utilização moderada e responsável dos mesmos, sensibilização dos profissionais e comunidade. A persistência de genes de resistência, mesmo com a diminuição da pressão seletiva, pode comprometer de uma forma muito séria a adoção de comportamentos mais prudentes nas comunidades médicas (humanas e veterinárias) e na população em geral.

# **Referências Bibliográficas**

- Abraham EP and Chain E. An Enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146-837.
- Abraham EP and Newton GGF. The structure of cephalosporin C. *Biochem J.* 1961; 79: 377 - 393.
- Adegoke OA and Quadri MO. Novel spectrophotometric determinations of some cephalosporins following azo dye formations with p-dimethylaminobenzaldehyde. *Arab J Chem.* 2012 (IN PRESS)
- Alanis AJ. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post – Antibiotic Era? *Arch Med Res.* 2005;36:697-705.
- Altparlak U, Koca O, Ozkurt Z, Akcay MN. Incidence and risk factors of vancomycin-resistant enterococcus colonization in burn unit patients. *Burns.* 2011;37:49-53.
- Amador, P. Pesquisa e caracterização molecular de  $\beta$ -lactamases em bactérias isoladas de alimentos prontos-a-comer. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia; 2010.
- Ambler RP. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-331.
- Aminov RI and Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;271:147 – 161.
- Andersson DI and Hughes D. Evolution of antibiotic resistance at non – lethal drug concentrations. *Drug Resist Update.* 2012;15:162 – 172.
- Azevedo IC, Duarte PM and Bordalo AA. Understanding spatial and temporal dynamics of key environmental characteristics in a mesotidal Atlantic estuary (Douro, NW Portugal). *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 2008; 76:620-633.
- Azevedo IC, Bordalo AA and Duarte PM. Influence of river discharge patterns on the hydrodynamics and potential contaminant dispersion in the Douro estuary (Portugal). *Water Res.* 2010;44:3133-3146.
- Babic M, Hujer AM and Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Update.* 2006; 9:142-156.
- Barros J, Igrejas G, Andrade M, Radhouani H, López M, Torres C and Poeta P. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistant enterococci. A potential bioindicator of marine contamination? *Mar Pollut Bull.* 2011; 62:1245-1248.
- Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Brit J Pharmacol.* 2008;153 (suppl):S347- S357.
- Bordalo AA. Microbiological water quality in urban coastal beaches: the influence of water dynamics and optimization of the sampling strategy. *Water Res.* 2003;37:3233-3241.
- Bradford, PA. Extended-Spectrum  $\beta$ - Lactamases in the 21<sup>st</sup> Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4):933-951.
- Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M and Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Meth.* 2010;82:229-233.
- Brown TA. Genomes, 2<sup>nd</sup> Edition. Oxford: Wiley-Wiss; 2002.
- Bush K. Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13:558-564.
- Bush K and Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New  $\beta$ -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:455-478.

- Bush K and Jacoby GA. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-976.
- Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 2001;32:243-259.
- Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C and Garrabé E. Bêtalactamines. *EMC- Maladies Infectieuses* 2004;1:129-202.
- Chait R, Craney A and Kishony R. Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature Lett.* 2007;446:668-671.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
- Corvec S, Crémet L, Leprince C, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D and Carroff N. Epidemiology of *Escherichia coli* clinical isolates producing AmpC plasmidic  $\beta$ -lactamase during a 5-year period in a French teaching Hospital. *Diagn Microbiol and Infec Dis.* 2010;67:277-281.
- Dalhoff A, Janjic N and Echols R. Redefining penems. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:1085-1095.
- Davies J and Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74 (3): 417-433.
- Decreto-Lei nº135/2009 de 3 de Junho. *Diário da República n.º107/2009- I Série.* Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional
- Di Conza JA and Gutkind GO. Integrons: gene collectors. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42(1):63-78.
- Doming KJ, Mayer HK and Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int J Food Microbiol.* 2003;88:147-164.
- Drawz SM and Bonomo, RA. Three Decades of  $\beta$ -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):160-201.
- EN ISO 6222 (1999) Water quality- Enumeration of culturable microorganisms – Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
- EN ISO 9308-1 (2000) Water quality-Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method.
- EN ISO 7899-2(2000) Water quality- Detection and enumeration of intestinal enterococci- Part 2: Membrane filtration method.
- ESAC- European Surveillance of Antimicrobial Consumption. *ESAC Yearbook ; 2009.*
- Fajardo A and Martínez JL. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11 : 161 – 167.
- Falcone- Dias MF, Vaz-Moreira I and Manaia CL. Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Res.* 2012;46:3612-3622.
- Fernandes R, Amador P and Prudêncio C.  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol.* 2012; IN PRESS.
- Fernandes R. Drug Resistance in *Enterobacteriaceae* Family- Epidemiological, Biochemical and Molecular Studies on  $\beta$ -lactamases. Tese de Doutoramento, Universidade de Vigo, Espanha; 2008.
- Ferreira W, Sousa J and Lima N. *Microbiologia.* LIDEL- Edições Técnicas; 2010.

Figueira V, Serra E and Manaia CM. Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *Sci Total Environ.* 2011;409:1017-1023.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *Brit J Exp Pathol.* 1929;10:226-236.

Fleming, A. Penicillin. Its practical application. The Blakiston Company. 1946.

Florea AB. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from Aries River (Romania). *Analele Universității din Oradca,- Fascicula Biologie.* 2011;18(1):34-38.

Frase H, Toth M, Champion MM, Antunes NT and Vakulenko SB. Importance of Position 170 in the Inhibition of GES-Type  $\beta$ -Lactamase by Clavulanic Acid. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2011;55(4):1556-1562.

Freitas AR, Novais C, Correia R, Monteiro M, Coque TM and Peixe L. Non-susceptibility to tigecycline in enterococci from hospitalized patients, food products and community sources. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38:174-176.

Garau G, Di Guilmi AM and Hall BG. Structure-based phylogeny of the metallo- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2778-2784.

Garau J. The Clinical Potential of Fourth- Generation Cephalosporins. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998; 31:479-480.

Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R and Pavilonis A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)* 2011;47(3):137-146.

Gottlieb T. and Nimmo GR. Antibiotic resistance is an emerging threat to public health: an urgent call to action at The Antimicrobial Resistance Summit. *Med J Australia.* 2011;194(6):281-283.

Griffith RS. Vancomycin use an historical review. *J Antimicrob Chemother.* 1984;14:D:1-5.

Hall BG and Barlow M. Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future. *Drug Resist Update.* 2004;7:111-123.

Hanson ND. AmpC  $\beta$ -lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:2-4.

Harada S. Genetic elements involved in the acquisition of antimicrobial resistance genes in bacteria. *Japanese J Clin Med.* 2012; 70(2):329-332.

Hawley PM and Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(suppl 1): i3-i10.

Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MS and Correia A. Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research Microbiol.* 2006; 157:938-947.

Hussain M, Hasan F, Shal AA, Hameed A, Jung M, Rayamajhi N, Cha S-B and Yoo HS. Prevalence of Class A and Amp C  $\beta$ -Lactamases in Clinical *Escherichia coli* Isolates from Pakistan Institute of Medical Science, Islamabad, Pakistan. *J Infect Dis.* 2011;64:249-252.

Jacoby GA.  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1123-1129.

Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-182.

- Janelidze N, Jaiani E, Lashkhi N, Tskhvediani A, Kokashvili T, Gvarishvili T, Jgenti D, Mikashavidze E, Diasamidze R, Narodny S, Obiso R, Whitehouse CA, Huq A and Tediashvili M. Microbial water quality of the Georgian coastal zone of the Black Sea. *Mar Pollut Bull.* 2011;62:573-580.
- Jarlier V, Nicolas M, Fournier D and Philippon. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988;10:867-878.
- Kanamori H, Navarro RB, Yano H, Sombrero LT, Capeding MR, Lupisan SP, Olveda RM, Arai K, Kunishima H, Hidakata Y and Kaku M. Molecular characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from the Philippines. *Acta Tropica.* 2011;120:140-145.
- Khardori N. Antibiotics- Past, Present and Future. *Med Clin N Am.* 2006;90:1049-1076.
- Kim YK, Cha CJ, Cerniglia CE. Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;210:239-244.
- Knothe H, Shal P, Krcmery V, Antal M and Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxima, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. *Infection.* 1983;11:315-317.
- Koczura R, Mokracka J, Jabłońska L, Gozdecka E, Kubek M and Kaznowski A. Antimicrobial resistance of integron-harboring *Escherichia coli* isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. *Sci Total Environ.* 2012;414:680-685.
- Kohanski MA, Dwyer DJ and Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(6):423-435.
- Kollef MH. New antimicrobial agents for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Crit Care Resusc.* 2009;11(4):282-286.
- Köseoğlu O. Integrons. *Mikrobiyol Bul.* 2004;38(3):305-312.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review- Part I. *Chemosphere.* 2009a;75:417-434.
- Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review- Part II. *Chemosphere.* 2009b;75:435-441.
- Kruijff B, Dam V and Breukink E. Lipid II: A central component in bacterial cell wall synthesis and a target for antibiotics. *Prostag, Leukotr Ess.* 2008;79:117-121.
- Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Deliver Rev.* 2005; 57: 1471– 1485.
- Lara F, Olmo-Iruela M.d, Cruces-Blanco C, Quesada-Molina C and García-Campana AM. Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography. *Trends in Anal Chem.* 2012;38:52-55.
- Leclerc R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319:157-160.
- Levy SB. The challenge of Antibiotic Resistance. *Sci Am.* 1998;46-53.
- Levy SB and Marshall B. Antimicrobial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 2004;10(suppl):S122-S129.
- Lipp, EK. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries.* 2001;24(2):266-276.

- Livermore DM. Defining an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Microbiol and Infect.* 2008;14(suppl 1): 3-10.
- Llarrull L, Testero SA, Fisher JF and Mobashery S. The future of the  $\beta$ -lactams. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13:551-557.
- Macedo AS, Freitas AR, Abreu C, Machado E, Peixe L, Sousa JC and Novais C. Characterization of antibiotic resistant enterococci isolated from untreated waters for human consumption in Portugal. *Int J Food Microbiol.* 2011; 145: 315-319.
- Madureira TV, Barreiro JC, Rocha MJ, Rocha E, Cass QB and Tiritan ME. Spatiotemporal distribution of pharmaceutical in the Douro River estuary (Portugal). *Sci Total Environ.* 2010;408:5513-5520.
- Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut.* 2009;157:2893–2902.
- McClintock B. Mutable loci in maize. *Carnegie Institution of Washington Yearbook* 50.1951; 174–181.
- Mendelson LM. Adverse reactions to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Immunology and Allergy Clinics of North America.* 1998; 18(4): 745-757.
- Messi P, Guerrieri E, Niederhäusern S, Sabia C and Bondi M. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int J Food Microbiol.* 2006;107:218-222.
- Moellering RC. Vancomycin: A 50-Year Reassessment. *Clin Infect Dis.* 2006; 42 (Suppl1):S3-S4.
- Moore JE, Moore PJA, Millar BC, Goldsmith CE, Loughrey A, Rooney PJ and Rao JR. The presence of antibiotic resistant bacteria along the River Lagan. *Agr Water Manage.* 2010; 98:217-221.
- Nelson DL and Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* W.H. Freeman; 2005.
- Newton GGF and Abraham EP. Degradation, structure and some derivatives of cephalosporin N. *Biochem J.* 1954;58:103-111.
- Novais C, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC and Peixe L. Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(6):3364-3368.
- Ogawa C, Liu YJ, Kobayashi KS. Muramyl dipeptide and its derivatives peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Curr Bioact Compd.* 2011;7(3):180-197.
- Okeke BC, Thomson MS and Moss EM. Occurrence, molecular characterization and antibiogram of water quality indicator bacteria in river water serving a water treatment plant. *Sci Total Environ.* 2011; 409:4979-4985.
- Oliveira AJ and Pinhata JM. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. Isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Res.* 2008;42:2242-2250.
- Pace JL and Yang G. Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:968-980.
- Palmer M. Efflux of Cytoplasmically Acting Antibiotics from Gram-Negative Bacteria: Periplasmic Substrate Capture by Multicomponent Efflux Pumps Inferred from Their Cooperative Action with Single-Component Transporters. *J Bacteriol.* 2003;185(17):5287–5289.
- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E and Iredel JR. Gene cassettes and cassette arrays immobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33:757–784.

- Paterson, DL and Bonomo RA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:657-686.
- Pfeifer Y, Cullik A and Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:371-379.
- Pietras Z, Bavro VN, Furnham N, Pellegrini-Calace M, Milner-White EJ and Luisi BF. Structure and mechanism of drug efflux machinery in Gram negative bacteria. *Curr Drug Targets.* 2008;9(9):719-28.
- Pitout JD, Hossain A and Hanson ND. Phenotypic and Molecular Detection of CTX-M- $\beta$ -Lactamases Produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5715-5721.
- Poirel L, Bonnin RA and Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution.* 2012;12:883-893.
- Pollack E and Pollack CV. Antibiotic use in the emergency Department: I. The Penicillins and Cephalosporins. *J Emerg Med.* 1996;14(2):213-222.
- Pournaras S, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Kristo I and Tsakris A. Detection of the new metallo-  $\beta$ -lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010;65:1604–1607.
- Pratt RF. Substrate specificity of bacterial DD peptidases (penicillin-binding proteins). *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65(14):2138-2155.
- Rahube TO and Yost CK. Antibiotic resistance plasmids in wastewater treatment plants and their possible dissemination into the environment. *Afr J Biotechnol.* 2010;9(54):9183-9190.
- Reading C and Cole M. Clavulanic acid: a  $\beta$ -lactamase- inhibiting  $\beta$ -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977;11:852-857.
- Rice LB. Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to  $\beta$ -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc.* 2012;87(2):198-208.
- Rodríguez-Baño J, Miró E, Villar M, Coelho A, Gozalo M, Borrell N, Bou G, Conejo MC, Pomar V, Aracil B, Larrosa N, Agüero J, Oliver A, Fernández A, Oteo J, Pascual A and Navarro F. Colonisation and infection due to *Enterobacteriaceae* producing plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases. *J Infection.* 2012;64:176-183.
- Sambrook J and Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold. Spring Harbor Laboratory Press, New York;2001.
- Sauvage E, Kerff, F, Terrak M, Ayala JA and Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32:234-258.
- Schneider T and Sahl HG. An oldie but a goodie – cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:161-169.
- Schwalbe R, Steele-Moore L and Goddwin AC. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols.* CRC Press, Taylor and Francis Group, 2007.
- Servais P and Passerat J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France) *Sci Total Environ.* 2009;408:365-372.
- Shleifer KH and Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 1972;36:407-77.

Silva MF da, Tiago I, Veríssimo A, Boaventura R, Nunes OC and Manaia CM. Antibiotic resistance of enterococci and related bacteria in an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006; 55:322-329.

Silveira ME, Freitas AR, Peixe L and Novais C. Environmental spread of antibiotic molecules, antibiotic resistance bacteria and genes: jigsaw pieces of public health problem. *Revista Faculdade de Ciências da Saúde.* 2009; 6: 244-253.

Singh J and Arrieta AC. New Cephalosporins. *Semin Pediatr Inf Dis.* 1999;10(1):14-22

Stroganov OV, Chilov GG and Švedas VK. Force field parametrization for 6-aminopenicillanic acid. *J Mol Struct: TEOCHEM.* 2003; 631(1-3):117-125.

Taylor NGH, Verner-Jeffreys DW and Baker-Austin C. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilizing antimicrobial resistance? *Trends in Ecology and Evolution.* 2011; 26(6):278-284.

Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med.* 2006; 34 (5 suppl): S3-S10;S64-73.

Uttley AH, Collins CH, Naidoo J and George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1988; 1: 57-58.

Vieira, A. Engenharia Genética, Princípios e Aplicações. LIDEL - Edições técnicas, 2001.

Vieira MEC and Bordalo AA. The Douro estuary (Portugal): a mesotidal salt wedge. *Oceanologia Acta.* 2000;23(5):585-594.

Vollmer W and Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(9):1714-1734.

Waksman SA. and Woodruff HB. Streptothricin, a new selective bacteriostatic and bactericidal agent, particularly active against gram-negative bacteria. *Proc Soc Exptl Biol Med.* 1942;49:207-210.

Wang M, Sahm DF, Jacoby GA and Hooper DC. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob agents Chemother.* 2004; 48(4):1295-1299.

Wasaznik A, Grinholc M and Bielawski KP. Active efflux as the multidrug resistance mechanism. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009;9(63):123-133

Wilke MS, Lovering AL and Strynadka NCJ.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:525-533.

Williams JD, Naber KG, Bryskier A, Hoiby N, Gould IM, Periti P, Giamarellou H. and Rouveix B. Classification of oral cephalosporins. A matter for debate. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17:443-450.

Wilson WR. The Role of Fourth-Generation Cephalosporins in the Treatment of Serious Infectious Diseases in Hospitalized Patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;31:473-477.

Wright GD. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7:563 – 569.

Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13:589-594.

Yim G, Huimi H and Davies J. The truth about antibiotics. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:163-170.

Zgurskaya HI. Molecular analysis of efflux pump based antibiotic resistance. *Int. J Med Microbiol.* 2002; 292:95–105.