

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Caracterização de genes de resistência a carbapenemos
em estirpes bacterianas isoladas de animais selvagens**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Carla Sofia Pereira Dias

Vila Real 2008

Instituição: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Curso: Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

Autor: Carla Sofia Pereira Dias

Orientador: Prof.^a Doutora Maria José Félix Saavedra

“As doutrinas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.”

“Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção do grau de Mestre em Biologia Clínica Laboratorial.”

AGRADECIMENTOS

A dificuldade da realização dum tese depende das adversidades, mas também dos apoios que vão surgindo, ao longo do trabalho. Neste sentido, gostaria de deixar aqui um agradecimento a algumas pessoas e instituições que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

Ao Professor Doutor Armando Mascarenhas Ferreira, na qualidade de Reitor da UTAD, o meu agradecimento pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria José Saavedra gostaria de expressar o meu agradecimento pelo interesse e valiosos conhecimentos dispensados na orientação deste trabalho, pelo encorajamento, apoio constante, tolerância e confiança em mim depositada.

Ao Prof. António Martínez-Murcia, Director do Laboratório de I&D *Molecular Diagnostic Center* (MDC), Alicante, Espanha, agradeço a sua colaboração neste trabalho, pelo interesse demonstrado e compreensão da importância da realização deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Veterinárias, pela disponibilização dos meios necessários para a realização deste trabalho, assim como, por toda a simpatia e apoio de funcionários e docentes deste departamento.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente à Anabela e a Ermelinda, pelo apoio que directa ou indirectamente me deram no decorrer deste trabalho. Obrigada por me ajudarem a descontraír e enfrentar as dificuldades com mais leveza.

À minha família um agradecimento muito especial. Por todo o seu apoio sem limites, por todo o seu amor e carinho, por tudo aquilo que representam...

FINANCIAMENTOS

A realização deste trabalho foi possível mediante o apoio financeiro das seguintes entidades:

CECAV - Centro de Estudos de Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

BGCT - Bolsa de Gestão de Ciência e Tecnologia com a referência SFRH/BGCT/33354/2008 (CECAV/CITAV)

TRABALHOS APRESENTADOS COM BASE NESTA TESE

Jornadas nacionais:

Dias, C., Mota, V. R., Ribeiro, E., Martinez-Murcia, A. Saavedra, M. J. 2008
Diversidade filogenética e perfil de susceptibilidade em estripes de *Aeromonas* spp.
isoladas de animais selvagens. Livro de resumos, *II Jornadas de Biologia*,
Biodiversidade/biadversidade, UTAD, Vila Real.

Congressos internacionais:

Dias, C., Mota V. R., Ribeiro E., Martinez-Murcia A., Saavedra M. J., 2008.
Phylogenetic diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. isolated from wild
animals. Livro de resumos do *9th international symposium on Aeromonas and
Pseudomonas*, UTAD, Vila Real.

RESUMO

O uso excessivo de antibióticos na medicina veterinária, na medicina humana, aquacultura e na agricultura tem contribuído para o aparecimento e disseminação de microrganismos multirresistentes. Os β -lactâmicos estão entre os antibióticos mais utilizados, tanto na terapêutica humana como na veterinária, nomeadamente no tratamento de infecções bacterianas dada a sua elevada eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para as células animais. De entre os β -lactâmicos, os carbapenemos são considerados os antibióticos mais eficazes. A produção de carbapenemases constitui um dos mecanismos de resistência emergente aos carbapenemos.

Dos quatrocentos e cinquenta e seis isolados (Gram negativo) de animais selvagens de diferentes nichos ecológicos, obtidos durante os dois períodos de amostragem: (i) Março a Junho de 2007 e (ii) Setembro a Novembro de 2007, no CRATAS projecto do NEPA sediado na UTAD. Foram seleccionadas vinte estirpes (durante os 7 meses) para serem estudadas devido ao facto de apresentarem pelo menos uma das seguintes características: resistentes aos carbapenemos e/ou todos os isolados pertencentes ao género *Aeromonas*.

A identificação dos isolados foi realizada por biotipificação numérica e por sequenciação dos genes 16S rDNA e *gyrB* tendo sido identificados os géneros *Aeromonas* (n=16), *Klebsiella* (n=1), *Pseudomonas* (n=1), *Shewanella* (n=1), e uma espécie não descrita do género *Acinetobacter* (n=1).

Determinou-se a susceptibilidade destas bactérias a vários grupos de antibióticos, pelo método de difusão em disco. Relativamente aos β -lactâmicos e em particular aos carbapenemos estudou-se os mecanismos de resistência associados aos fenótipos observados. De um modo geral verificou-se multiresistência das estirpes isoladas aos antibióticos testados, permitindo os resultados obtidos inferir sobre o facto de apesar de existir uma baixa pressão selectiva a que as estirpes ambientais estão submetidas, estas podem ser reservatórios de genes de resistência. De salientar o facto de quatro dos isolados apresentarem resistência aos carbapenemos (imipenemo), antibióticos usados apenas para uso clínico em ambiente hospitalar, o que justificou o estudo dos mecanismos de resistência subjacentes ao fenótipo observado. Na detecção de genes de β -lactamases, nomeadamente β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) e carbapenemases (serina carbapenemases e metalo- β -lactamases) esta foi verificada em

dois dos isolados MDC 1277 (tipo-OXA) e MDC 1280 (tipo-OXA, tipo-TEM e tipo-SHV).

O teste de difusão em agar Mueller-Hinton com tiras (E-test) e o teste de sinergismo do duplo disco foram usados para a triagem dos isolados relativamente a presença de β -lactamases de espectro alargado, observando-se que apenas o isolado MDC 1280 apresentou teste fenotípico positivo, em ambos os testes.

Nos dezasseis isolados do género *Aeromonas* as metalo- β -lactamases tipo-IMP e tipo-VIM não foram detectadas. Verificou-se a presença de CphA em sete dos isolados identificados como *Aeromonas*. Em quatro isolados *bla*_{CphA} positivos foi detectado também o gene *bla*_{OXA}. De referir que estes isolados não apresentavam um fenótipo de resistência aos carbapenemos.

ABSTRACT

The excessive use of antibiotics in veterinary medicine, in human medicine, aquaculture and agriculture has contributed to the emergence and spread of multi-resistant organisms. The β -lactam antibiotics are among the most widely used both in human and in veterinary therapies, particularly in the treatment of bacterial infections because of their high therapeutic efficacy and generally low toxicity to animal cells. Among the β -lactams, the carbapenems are considered the most effective antibiotics. The production of carbapenemases is one of the emerging mechanisms of resistance to carbapenems.

Of four hundred and fifty-six isolates (Gram negative) from wild animals of different ecological niches, obtained during the two periods: (i) March to June 2007 and (ii) in September to November 2007, in the CRATAS (NEPA) project of UTAD, twenty were selected (during the 7 months) to be studied since they possessed at least one of the following characteristics: resistance to carbapenems and / or all isolates included in the genus *Aeromonas*.

The identification of the isolates was performed by numerical bio-typing and by sequencing the 16S rRNA gene and the gene *gyrB*. The isolates included those from genera *Aeromonas* (n = 16), *Klebsiella* (n = 1), *Pseudomonas* (n = 1), *Shewanella* (n = 1), and a previously un-described species of the genus *Acinetobacter* (n = 1). The susceptibility of the bacteria to various groups of antibiotics was determined using the disk diffusion method. The mechanisms of resistance to β -lactams and in particular to carbapenems associated with the phenotypes observed were studied. In general multi-resistance was observed for the isolated strains. These results infer that there is a low selection pressure and that these environmental strains may be reservoirs of resistant genes. We must emphasize the fact that 25% of the isolates were resistant to carbapenems, antibiotics used only for clinical use in hospitals, which justified the study of mechanisms underlying the resistance phenotype observed. Genes of β -lactamases were only found in two strains of MDC 1277 (oxa-type) and MDC 1280 (oxa-type, TEM-type and SHV-type).

The test on Mueller-Hinton agar with strips (E-test) and the test for synergism of the double disc were used to assess the presence of β -lactamases of extended spectrum, noting that only the isolate MDC 1280 was positive in both tests. In sixteen of the

isolates belonging to genus *Aeromonas* the metallo- β -lactamases IMP and VIM were not detected. By sequencing the CphA gene was found in seven of these isolates. In four that were *bla*_{CphA} positive the gene *bla*_{OXA-type} was also detected the gene. It should be noted that these isolates did not have a phenotype of resistance to carbapenems.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ix
FINANCIAMENTO	XI
TRABALHOS APRESENTADOS COM BASE NESTE TRABALHO	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
ÍNDICE	xix
ÍNDICE DE FIGURAS	xxiii
ÍNDICE DE QUADROS	xxv
ÍNDICE DE TABELAS	xxvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Antibióticos β-lactâmicos	1
1.1.1 Carbapenemos	2
1.2 Mecanismos de resistência aos β-lactâmicos	3
1.2.1 Diminuição da acumulação intracelular do antibiótico	3
1.2.1.1 Redução da permeabilidade da membrana exterior	3
1.2.1.2 Mecanismos de efluxo	4
1.2.2 Modificação do local alvo do antibiótico (Penicillin-Binding-Protein)	5
1.2.3 Inativação dos β -lactâmicos pela produção de β -lactamases	6
1.2.3.1 Classificação	7
1.3 Carbapenemases	8
1.3.1 Carbapenemases de centro serina	8
1.3.2 Metalo- β -lactamases	10
2. OBJECTIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Origem das amostras	15
3.2 Recolha das amostras	16
3.3 Tratamento das amostras em laboratório	16
3.4 Isolamento de estirpes	16
3.5 Conservação dos isolados bacterianos	17
3.6 Provas morfo-fisiológicas	17

3.6.1 Coloração de Gram.....	17
3.6.2 Prova da citocromo-oxidase	18
3.6.3 Prova da catalase	18
3.7 Identificação dos isolados bacterianos.....	19
3.7.1. Biotipificação numérica.....	19
3.7.1.1 Sistema de identificação numérica API 20E (bioMérieux 20 100).....	19
3.7.1.2 Sistema de identificação numérica API 20NE (bioMérieux 20 050)	19
3.7.2 Identificação genética	20
3.7.2.1 Extração de DNA total.....	20
3.7.2.2 Amplificação de DNA por reacção de PCR	21
3.7.2.3 Purificação dos produtos de PCR	22
3.7.2.4 Sequenciação	22
3.7.2.5 Análise de sequências e construção dos dendogramas.....	23
3.8 Determinação <i>in vitro</i> da susceptibilidade a agentes antimicrobianos	24
3.8.1 Método de difusão em disco: técnica de Kirby-Bauer	24
3.8.2 Método de difusão em agar com tiras (E-test).....	24
3.8.3 Teste de sinergismo do duplo disco.....	25
3.9 Detecção de β-lactamases	25
3.9.1 Caracterização das β -lactamases	25
3.9.1.1 Preparação dos extractos enzimáticos	25
3.9.1.2 Prova do nitrocefim	26
3.9.1.3 Determinação do ponto isoeléctrico (pI) das β -lactamases	26
3.9.1.4 Pesquisa fenotípica: carbapenemases por um ensaio microbiológico	27
3.9.2 Pesquisa genotípica de β -lactamases	27
3.9.2.1 Amplificação de genes <i>bla</i>	27
4. Resultados e Discussão	29
4.1 Isolados bacterianos utilizados	29
4.2 Provas morfo-fisiológicas	30
4.3 Identificação dos isolados bacterianos	31
4.3.1 Sistema de identificação numérica API 20E (bioMérieux 20 100).....	31
4.3.2 Sistema de identificação numérica API 20NE (bioMérieux 20 050).....	31
4.3.3 Identificação genética	33
4.4 Perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos.....	38

4.4.1 Método de difusão em disco.....	38
4.4.2 Método de difusão em agar com tiras (E-test).....	40
4.4.3 Teste de sinergismo do duplo disco.....	41
4.5 Caracterização de β-lactamases	42
4.5.1 Teste do nitrocefim.....	42
4.5.2 Determinação do ponto isoelétrico das β -lactamases	43
4.5.3 Detecção de carbapenemases por um ensaio microbiológico	43
4.5.4 Detecção genotípica de carbapenemases	44
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
6. BIBLIOGRAFIA	50
ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química do imipenemo (A), meropenemo (B) e ertapenemo (C).....	2
Figura 4.1 - Percentagem de isolados bacterianos pertencentes às <i>Enterobacteriaceae</i> (oxidase negativa) e às não <i>Enterobacteriaceae</i> (oxidase positiva)	31
Figura 4.2 - Árvore filogenética obtida com a sequência do gene 16S rDNA da estirpe AS027 A _{3a} (MDC1281) isolada neste estudo, na figura a verde, e as estirpes do género <i>Acinetobacter</i> e com isolados com maior grau de homologia com a estirpe.....	35
Figura 4.3 - Árvore filogenética obtida com a sequência do gene <i>gyrB</i> das estirpes isoladas neste estudo, na figura a verde, e as estirpes da colecção do MDC representativas de todas as espécies do género <i>Aeromonas</i>	37
Figura 4.4 - Perfil de susceptibilidade dos isolados pertencentes ao género <i>Aeromonas</i>	40
Figura 4.5 - Pesquisa de ESBLs pelo método de difusão em agar com tiras, estirpe AS027A _{3a} (MDC1281).....	41
Figura 4.6 - Pesquisa de ESBLs pelo método de sinergismo do duplo disco na estirpe AS027A ₂ (MDC1280).	42
Figura 4.7 Figura 4.7 - Resultados do teste do nitrocefim das estirpes AS006 C ₂ (MDC 1276), AS006C _{3b1} (MDC 180), AS006 C _{3c1} (MDC 182), AS008 A ₁ (MDC 1277), AS027 A ₂ (MDC 1280), AS027 A _{3a} (MDC 1281), AS036 A _{2a1B} (MDC 2485), AS036 B _{1a2} (MDC 2486), AS044 A _{2a1(A)} (MDC 2487) e AS115 A _{2GSP1} (MDC 2492).....	42
Figura 4.8 – Ensaio microbiológico para a pesquisa de carbapenemases.....	43

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 3.1 - Recolha das amostras	16
Quadro 3.2 - Procedimento para obtenção de cultura inicial	16
Quadro 3.3 - Obtenção de cultura pura	16
Quadro 3.4 - Conservação dos isolados bacterianos	17
Quadro 3.5 - Procedimento de coloração pelo método de Gram.....	17
Quadro 3.6 - Prova da citocromo - oxidase.....	18
Quadro 3.7 - Prova da catalase.....	18
Quadro 3.8 - Sistema numérico API 20E (bioMérieux 20 100).....	19
Quadro 3.9 - Sistema numérico API 20NE (bioMérieux 20 050).....	20
Quadro 3.10 - Metodologia de extracção de DNA total, de estirpes bacterianas	20
Quadro 3.11 - Oligonucleótidos utilizados em reacção de PCR	21
Quadro 3.12 - Protocolo de purificação de produtos de PCR	22
Quadro 3.13 - Oligonucleótidos utilizados nas reacções de sequenciação.....	22
Quadro 3.14 - Protocolo de precipitação dos produtos de sequenciação	23
Quadro 3.15 - Técnica de difusão em agar com discos de antibióticos.....	24
Quadro 3.16 - Técnica de difusão em agar com tiras	25
Quadro 3.17 - Teste de sinergismo do duplo disco	25
Quadro 3.18 - Preparação dos extractos enzimáticos	26
Quadro 3.19 - Bioensaio para detecção de enzimas	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Número de amostras utilizadas por espécie de animal	15
Tabela 4.1 - Isolados bacterianos utilizados neste trabalho	30
Tabela 4.2 - Provas bioquímicas do API20E (bioMérieux 20 100).....	31
Tabela 4.3 - Provas bioquímicas do API20NE (bioMérieux 20 050).....	32
Tabela 4.4 - Identificação das espécies sequenciadas por 16S rDNA, referência UTAD e referência MDC.....	34
Tabela 4.5 - Estirpes bacterianas com idênticas sequências de <i>gyrB</i>	36
Tabela 4.6 - Perfis de susceptibilidade dos isolados resistentes ao imipenemo.....	39
Tabela 4.7 - Genes de resistência aos β -lactamases amplificados nas estirpes resistentes aos carbapenemos e nas estirpes do genro <i>Aeromonas</i>	46

INTRODUÇÃO

Os antibióticos são indiscutivelmente a mais bem sucedida forma de quimioterapia desenvolvida no século XX e, talvez, ao longo de toda a história da medicina (Wright, 2007).

1.1 ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os β -lactâmicos estão entre os antibióticos mais utilizados no tratamento de infecções bacterianas, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, dada a sua elevada eficácia terapêutica e a sua baixa toxicidade para as células animais, incluindo as células humanas. Contudo a eficácia destes antimicrobianos está constantemente a ser desafiada pela emergência de estirpes bacterianas resistentes (Crowder *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007).

Os antibióticos β -lactâmicos apresentam em comum um anel β -lactâmico central constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio (azeto), com radicais substituintes, o qual é responsável pelo mecanismo de acção destes compostos a nível da formação da parede celular (Sousa, 2006).

Nas penicilinas o anel β -lactâmico encontra-se unido com um anel tiazolidina, enquanto que nas cefalosporinas se encontra fundido com um anel de di-hidrotiazina. Os monobactâmicos (aztreonamo) têm a particularidade de apresentar na sua estrutura monocíclica um grupo 2-oxoazetidina-1-sulfário, apresentando no entanto uma grande analogia com a ceftazidima.

Os carbapenemos possuem um átomo de carbono em vez de um átomo de enxofre no anel de tiazolidina, anel anexo ao anel β -lactâmico, e uma dupla ligação em vez de uma ligação simples (Sousa, 2006; Nicolau, 2008). Esta classe de antimicrobianos é activa em microrganismos em crescimento, e a inibição da formação da parede celular resulta da ligação do antibiótico a uma ou várias transpeptidases. A capacidade que estes antibióticos têm para se ligarem às transpeptidases, deve-se à elevada semelhança estequiométrica destas enzimas com o anel β -lactâmico. Por este motivo as transpeptidases são frequentemente denominadas de proteínas de ligação à penicilina (PBPs - Penicillin binding proteins). Estas enzimas estão relacionadas com funções

celulares de alongamento e septação da parede celular, variando as suas características e o seu número de espécie para espécie (Wilke *et al.*, 2005; Babic *et al.*, 2006; Pena, 2006).

A acção dos β -lactâmicos depende da sua capacidade de difusão através dos canais de porinas da parede celular, da afinidade do antibiótico às PBPs e da estabilidade do antibiótico a hidrólise mediada por enzimas bacterianas (Pena, 2006).

1.1.1 Carbapenemos

Os carbapenemos são caracterizados por possuírem um amplo espectro de actividade *in vitro* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo bactérias anaeróbias. O seu elevado espectro de actividade é devido ao facto de ser uma molécula zwitteriónica, com uma elevada capacidade para penetrar através dos canais de porinas, uma elevada afinidade para as PBPs e com uma elevada estabilidade à hidrólise mediada por β -lactamases (Sousa, 2006; Bassetti *et al.*, 2008). De entre os β -lactâmicos, os carbapenemos são considerados os antibióticos mais eficazes, sendo geralmente reservados para o tratamento das infecções bacterianas mais severas (Nicolau, 2008).

Esta classe de antibióticos é resistente à hidrólise por β -lactamases pertencentes às classes A, C e D de Ambler, incluindo as ESBLs (β -lactamases de largo espectro). Contudo são susceptíveis à actividade das carbapenemases (Tellado e Wilson, 2005; Nicolau, 2008).

O imipenemo, o meropenemo e o ertapenemo são os agentes antimicrobianos pertencentes à classe dos carbapenemos disponíveis em Portugal para uso clínico, sendo o imipenemo e o meropenemo os mais utilizados (Sousa, 2006).

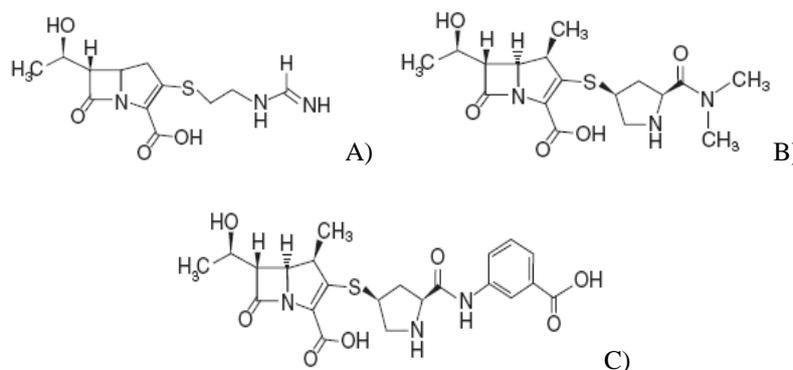


Figura 1.1 - Estrutura química do imipenemo (A), meropenemo (B) e ertapenemo (C). [Fonte: Zhanel *et al.*, 2007].

1.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS

O uso excessivo de antibióticos na medicina humana, na medicina veterinária, na aquicultura e na agricultura tem contribuído para o aparecimento e disseminação de microrganismos multirresistentes (French, 2005; Henriques *et al.*, 2006b).

Nos últimos anos a emergência de bactérias patogênicas resistentes aos β -lactâmicos em ambientes clínicos tem-se tornado num problema mundial. Além disso os genes que codificam para a resistência a este grupo de antibióticos têm sido também encontrados em estirpes bacterianas ambientais (Chee-Sanford *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2003; Henriques *et al.*, 2006).

A resistência bacteriana ocorre devido a características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca ou adquirida. A resistência adquirida resulta de alterações na estrutura e na fisiologia celular, causadas por mudanças na genética normal do microrganismo. Estas alterações podem ocorrer devido a mutações genéticas, aquisição de genes de outros microrganismos ou pela associação de ambas. A resistência intrínseca resulta da genética normal dos microrganismos. Todas as estratégias de resistência nas bactérias são codificadas por um ou mais genes, os quais podem estar presentes no genoma de vários microrganismos, que podem ou não pertencer ao mesmo género (Dropa, 2006).

Actualmente são conhecidos três mecanismos de resistência aos carbapenemos: (i) diminuição da acumulação intracelular do antibiótico; (ii) modificação do local alvo do antibiótico (PBPs); (iii) inactivação do antibiótico através de enzimas denominadas β -lactamases (Sousa, 2006).

1.2.1 Diminuição da acumulação intracelular do antibiótico

A diminuição da concentração do antibiótico no interior da célula bacteriana pode ser devida: (i) à redução da permeabilidade da membrana exterior e/ou (ii) por mecanismos de efluxo.

1.2.1.1 Redução da permeabilidade da membrana exterior

A parede celular das bactérias pode ser por si só uma barreira de permeabilidade aos antimicrobianos, levando à resistência intrínseca de muitos microrganismos.

As bactérias de Gram negativo são responsáveis por uma grande percentagem de infecções bacterianas multirresistentes. Estas bactérias possuem na membrana externa canais de proteínas, denominados porinas, que estão envolvidas no influxo de diversos compostos, incluindo diversas classes de antibióticos (Pagès *et al.*, 2008).

Os antibióticos β -lactâmicos são moléculas hidrofóbicas, que têm de atravessar a membrana exterior das bactérias de Gram negativo para atingirem as PBPs. A difusão destes antibióticos para o espaço periplasmático efectua-se devido à existência dos canais de porinas (Nicolau, 2008).

O aumento da resistência bacteriana aos β -lactâmicos, está muitas vezes relacionada com a alteração da permeabilidade da membrana externa, por ausência ou diminuição da expressão de genes que codificam as porinas, causando a redução da entrada do antibiótico na célula, diminuído assim a concentração interna do antibiótico (Nikaido, 2003; Quale *et al.*, 2006). Este mecanismo de resistência acarreta, frequentemente, resistências múltiplas, visto que diferentes antibióticos são transportados para o interior da célula bacteriana pelos mesmos canais de porinas (Fonseca, 2005).

1.2.1.2 Mecanismos de efluxo

A sobreexpressão de sistemas de efluxo, que levam à redução da concentração dos agentes antimicrobianos no interior da célula bacteriana, constitui um dos mecanismos de resistência aos carbapenemos (Wilke *et al.*, 2005; Giske *et al.*, 2008). Os genes que codificam os sistemas de efluxo fazem parte do genoma bacteriano e, portanto, fornecem ao microrganismo o potencial intrínseco para desenvolver um fenótipo de resistência aos carbapenemos sem a aquisição de novos genes (Nikaido, 2001; Wright, 2007).

Muitos destes sistemas não são específicos para uma classe de antibióticos, podendo eliminar da célula bacteriana uma elevada gama de compostos estruturalmente desiguais, incluindo várias classes de antibióticos, estando por isso muitas vezes associados a estirpes multirresistentes. A actividade de alguns sistemas de efluxo pode ser induzida pela exposição ao substrato, de modo que uma estirpe aparentemente susceptível a um antibiótico pode tornar-se resistente (Poole, 2005; Piddock, 2006).

Os sistemas de efluxo são agrupados em cinco famílias de acordo com a sequência de aminoácidos das proteínas envolvidas; a família MFS (Major Facilitator Superfamily), ABC (ATB-Binding Cassete), RND (Resistance-Nodulation-Division), MATE

(Multidrug And Toxic compound Extrusion) e a família SMR (Small Multidrug Resistance) (Li e Nikaido, 2004; Alekshun e Levy, 2007). A família RND é a mais relevante para a resistência aos carbapenemos.

Cada sistema de efluxo da família RND é constituído por três proteínas, que podem ser codificadas por genes cromossómicos ou plasmídicos; (i) proteína responsável pelo efluxo através da membrana citoplasmática, (ii) proteína de fusão membrana periplasmática (MFP) e a (iii) proteína que efectua o efluxo através da membrana exterior (OMF) (Poole, 2004; Poole, 2007).

Van Bambeke e colaboradores (2003) assim como outros autores referem que a presença de bombas de efluxo podem actuar associadas com outros mecanismos de resistência, para aumentar o nível e a amplitude do espectro de resistência aos agentes antimicrobianos.

1.2.2 Modificação do local alvo do antibiótico (Penicillin binding protein)

As penicillin binding proteins são carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática das bactérias que catalisam as reacções de polimerização do peptidoglicano durante a biosíntese da parede celular bacteriana (Macheboeuf *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2008). Os carbapenemos apresentam uma elevada afinidade para as PBPs, impedindo a sua actividade (Davies *et al.*, 2008).

Mutações nos genes produtores de PBPs, recombinações homólogas entre genes de PBPs, ou a inserção de novos genes que codificam para PBPs sem afinidade para os carbapenemos, conferem às estirpes resistência aos carbapenemos (Sousa, 2006; Giske *et al.*, 2008).

As PBPs podem ser divididas em três classes: (i) PBPs de elevado peso molecular (HMM- High molecular mass) de classe A; (ii) PBPs de elevado peso molecular (HMM- High molecular mass) de classe B; e (iii) PBPs de baixo peso molecular (LMM- Low molecular mass) (Yamada *et al.*, 2008).

A resistência aos carbapenemos por alteração das PBPs é mais comum em microrganismos de Gram positivo, do que de Gram negativo (Sousa, 2006). Este mecanismo de resistência é importante em cocos Gram positivos tais com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (Pitout *et al.*, 1997). Estudos de Fernandez-Cuenca e colaboradores (2003), em isolados de *Acinetobacter baumannii* demonstraram que a resistência aos carbapenemos nestes isolados estava relacionada

com a diminuição da expressão da PBP 2. A produção de PBPs alteradas com reduzida afinidade para os β -lactâmicos tem sido observada em isolados de *Proteus mirabilis* (Neuwirth *et al.*, 1995), de *Pseudomonas aeruginosa* (Gonton *et al.*, 1990) e de *Helicobacter pylori* (Gerrits *et al.*, 2002).

1.2.3 Inativação dos β -lactâmicos pela produção de β -lactamases

O principal mecanismo de resistência bacteriana (intrínseca e adquirida) aos β -lactâmicos, particularmente entre as bactérias de Gram negativo, é a produção de hidrolases bacterianas, denominadas de β -lactamases (Lim e Strynadk, 2002; Li *et al.*, 2007)

As β -lactamases são hidrolases que actuam ao nível do anel β -lactâmico, clivando a ligação amida, tornado estes antibióticos em compostos biologicamente inactivos, antes destes atingirem as PBPs (Poole, 2004; Bebrone, 2007). As enzimas β -lactamases são estruturalmente relacionadas com as PBPs de baixo peso molecular, indicando que terão evoluído a partir destas enzimas (González, 2007).

Em 1940 Abraham e Chain descreveram a primeira enzima com actividade hidrolítica sobre os β -lactâmicos, ao observarem a inactivação da penicilina por estirpes de *Escherichia coli*, denominando estas enzimas pelo nome genérico de penicilinasas (Gupta, 2007). Mais tarde Kirby (1944) verifica que a síntese destas enzimas não era exclusiva das bactérias de Gram negativo, ao isolar estirpes de estafilococos resistentes à penicilina.

Desde então estas enzimas têm sido descritas em bactérias de Gram negativo e Gram positivo (Livermore, 1995; Majiduddin *et al.*, 2002). As β -lactamases, produzidas por algumas bactérias de Gram positivo e por todas as bactérias de Gram negativo, são diversas e numerosas podendo ser codificadas por genes localizados no cromossoma ou por genes localizados em plasmídeos.

A disseminação das β -lactamases tem aumentado ao longo dos anos, devido à integração dos genes que as codificam em plasmídeos, transposões e integrões, elementos genéticos móveis, que facilitam a rápida transferência de material genético entre os microrganismos (Weldhagen, 2004; Castanheira, 2005; Wilke *et al.*, 2005; Babic *et al.*, 2006).

1.2.3.1 Classificação

A grande diversidade de β -lactamases isoladas nas últimas décadas tornou imprescindível a existência de um sistema de classificação que facilitasse a sua identificação e que traduzisse as relações entre as diferentes enzimas e a sua origem evolutiva. As β -lactamases podem ser diferenciadas por vários critérios. Actualmente dois sistemas de classificação são considerados como de maior importância: a classificação de Ambler e a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

A classificação de Ambler, proposta em 1980, baseia-se na estrutura primária da enzima, de acordo com a sequência de aminoácidos. Ambler dividiu as β -lactamases em quatro classes principais: classe A onde se encontram as β -lactamases de amplo espectro, classe B onde são incluídas as metalo- β -lactamases, classe C as cefalosporinas cromossómicas e a classe D onde se encontram as oxacilinas.

Em 1989 Bush foi o primeiro a correlacionar o substrato preferencial e as propriedades inibitórias com a estrutura molecular das enzimas, na sua classificação. Mais tarde, em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros fizeram uma actualização desta classificação que combina características funcionais e estruturais das enzimas, agrupando as β -lactamases em quatro grupos funcionais (1, 2, 3 e 4). A acção quelante do EDTA é usada por este sistema de classificação para a primeira triagem das β -lactamases.

No grupo funcional 1 são incluídas as β -lactamases que não são inibidas pelo EDTA e que hidrolisam preferencialmente a cefaloridina, sendo denominadas de cefalosporinases. O grupo funcional 2 inclui enzimas que não são inibidas pelo EDTA, mas sim pelos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) e que preferencialmente hidrolisam a benzilpenicilina, designadas por penicilinas. No grupo funcional 2 são também incluídas as β -lactamases de espectro alargado. O grupo funcional 3 engloba as β -lactamases que são inibidas pelo EDTA e não pelos inibidores de β -lactamases, e que hidrolisam mais facilmente os carbapenemos, sendo denominadas por carbapenemases. No grupo funcional 4 são agrupadas as enzimas que não são inibidas por EDTA, mas que não se adequam a nenhum dos grupos anteriormente descritos.

1.3 CARBAPENEMASES

Várias enzimas de ocorrência natural com capacidade de hidrolisar os carbapenemos têm sido descritas desde 1980. Inicialmente este grupo de enzimas foi geralmente descrito em espécies com pouca relevância a nível clínico, contudo o seu número tem aumentado nos últimos anos (Livermore e Woodlord, 2000; Bradford, 2001).

De acordo com Nordmann e Poirel (2002), as carbapenemases são um grupo de enzimas diversificado, que diferem das restantes β -lactamases por serem activas não só para as cefalosporinas de amplo espectro como também para os carbapenemos, imipenemo e meropenemo (Poirel *et al.*, 2007).

As carbapenemases podem ser divididas em dois grupos moleculares, de acordo com o mecanismo de hidrólise no centro activo da molécula: carbapenemases serínicas, enzimas que possuem serina no centro activo, e metalo- β -lactamases, enzimas que possuem iões de zinco no centro activo (Frère *et al.*, 2005; Queenan e Bush, 2007). Este grupo de enzimas é constituído por β -lactamases pertencentes às classes A (penicilinases), B (metalo- β -lactamases) e D (oxacilinases) de Ambler.

1.3.1 Carbapenemases de centro serina

As carbapenemases pertencentes às classes A e D da classificação de Ambler são denominadas de carbapenemases serínicas por possuírem no seu centro activo um resíduo de serina (Rasmussen e Hoiby, 2007).

As carbapenemases de classe A (grupo funcional 2f de Bush *et al.*, 1995) têm sido descritas maioritariamente em isolados de *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* (Medeiros e Hare, 1986; Yang *et al.*, 1990; Nordmann *et al.*, 1993; Moland *et al.*, 2007) e em isolados ambientais de *Serratia fonticola* (Henriques *et al.*, 2004). Este grupo de enzimas é constituído pelas famílias NMC, IMI, SME, KPC, GES e SFC. Todas estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar uma grande variedade de β -lactâmicos incluindo carbapenemos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonamo, e são inibidas pelos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) (Queenan e Bush, 2007).

A primeira carbapenemase de classe A, a enzima Sme-1 foi descrita em Inglaterra (1982) em dois isolados de *Serratia marcescens* (Yang *et al.*, 1990; Naas *et al.*, 1994).

Mais tarde, é descrita uma carbapenemase mutante pontual de Sme-1, designada Sme-2, em estirpes de *Serratia marcescens* nos Estados Unidos (Queenan *et al.*, 2000).

Pouco depois são identificadas as enzimas IMI e NMC-A em isolados de *Enterobacter cloacae* nos Estados Unidos, França e Argentina (Nordmann *et al.*, 1993; Rasmussen *et al.*, 1996; Pottumarthy *et al.*, 2003; Radice *et al.*, 2004). Os genes destas três carbapenemases estão localizados no cromossoma, sem haver evidência de estarem associados a elementos genéticos móveis, o que explica a sua raridade (Yu *et al.*, 2006). A carbapenemase IMI-1 foi identificada em duas estirpes de *Enterobacter cloacae* na Califórnia em 1984 (Rasmussen *et al.*, 1996). Recentemente, foi verificada a expressão de uma carbapenemase, da família IMI (IMI-2) codificada por um gene localizado num plasmídeo de *Enterobacter cloacae* nos Estados Unidos e na China (Aubron *et al.*, 2005).

A enzima KPC-1 foi identificada em *Klebsiella pneumonia* no norte da Califórnia e confere resistência aos carbapenemos, cefalosporinas de espectro alargado e aztreonam (Yigit *et al.*, 2001). Posteriormente, foi descrita uma segunda carbapenemase plasmídica, KPC-2, em *K. oxytoca* (Yigit *et al.*, 2003), que difere da KPC-1 apenas em um aminoácido. Outra carbapenemase de classe A, a enzima SFC-1 produzida por *Serratia fonticola*, foi descrita em 2004 por Henriques e colaboradores (Henriques *et al.*, 2004). Na mesma estirpe foi descrita uma metalo- β -lactamase (Saavedra *et al.*, 2003). Uma análise dos parâmetros cinéticos da enzima SFC-1 mostrou que esta apresenta um amplo perfil de actividade, semelhante ao de outras carbapenemases do grupo 2f (Yang *et al.*, 1990; Mariotte-Boyer *et al.*, 1996; Rasmussen *et al.*, 1996; Yigit *et al.*, 2001). No entanto esta enzima exibe uma elevada eficiência catalítica para a ceftazidima e cefoxitina, taxas ligeiramente superiores ao demonstrado pela IMI-1 e KPC-1 (Fonseca *et al.*, 2007).

A primeira enzima da família GES, inicialmente definida como β -lactamases de espectro ampliado (Giakkoupi *et al.*, 2000), foi identificada na Grécia num isolado de *E. cloacae* em 2000, tendo-se verificado em 2001, com a descrição da enzima GES-2 numa estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenemo, que este grupo de enzimas possuía também a capacidade de hidrolisar os carbapenemos (Poirel *et al.*, 2001; Queenan e Bush, 2007).

As carbapenemases de classe D, também denominadas de oxacilinases, embora apresentem uma fraca actividade contra os carbapenemos *in vitro*, são associadas à

resistência aos carbapenemos *in vivo*, possivelmente devido à permeabilidade limitada das estirpes (Poole, 2004). Um número limitado de carbapenemases de classe D, com alguma actividade contra os carbapenemos, tem sido descrito maioritariamente em isolados de *Acinetobacter baumannii* (Poirel e Nordmann, 2006): OXA-23, OXA-27 (Nordmann e Poirel, 2002) e OXA-40 (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002). A primeira oxacilinase com actividade contra os carbapenemos, descrita por Paton e colaboradores, em 1993 foi identificada num isolado de *Acinetobacter baumannii*, tendo sido designada por ARI-1 (Scaife *et al.*, 1995). Algum tempo depois a sequenciação desta enzima revelou que a enzima ARI-1 pertencia à classe das oxacilinases, tendo sido denominada de OXA-23 (Donald *et al.*, 2000). A OXA-23 tem sido identificada em isolados de *A. baumannii* resistentes aos carbapenemos no Brasil, Reino Unido, Coreia e Taiti (Dalla-Costa *et al.*, 2003; Naas *et al.*, 2005; Turton *et al.*, 2005). A enzima, OXA-23, foi ainda descrita num plasmídeo de *Proteus mirabilis* (Bonnet *et al.*, 2002), e de *Klebsiella pneumonia* (Poirel *et al.*, 2004).

1.3.2 Metallo- β -lactamases

As metallo- β -lactamases são enzimas que hidrolisam os antibióticos β -lactâmicos recorrendo a um ou dois co-factores de zinco no centro activo da molécula (Bush, 1998; Wang *et al.*, 1999) daí a designação de metallo- β -lactamases.

As carbapenemases de classe B (metallo- β -lactamases), grupo funcional 3, são caracterizadas por possuírem a capacidade de hidrolisar eficientemente os carbapenemos, serem resistentes aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) e serem susceptíveis à acção de metais quelantes, como por exemplo o EDTA (Walsh *et al.*, 2005). Para além dos carbapenemos, estas enzimas hidrolisam as cefalosporinas de amplo espectro e penicilinas, mas não os monobactâmicos (Queenan e Bush, 2007). Quando as metallo- β -lactamases são agrupadas de acordo com a homologia das sequências de aminoácidos são evidenciados três grupos estruturais: Ba, Bb e Bc (Galleni *et al.*, 2001).

A primeira metallo- β -lactamase, a enzima BcII de *Bacillus cereus* foi descrita nos meados da década de 60 (Sabath e Abraham, 1966). Uma nova enzima dependente de zinco, a enzima L1, produzida por *Pseudomonas maltophilia* (*Xanthomonas* ou mais recentemente *Stenotrophomonas*) foi descrita por Saino e colaboradores em 1982.

Posteriormente, foram identificadas metalo- β -lactamases que hidrolisavam o imipenemo, em isolados de *Aeromonas hydrophila* (Shannon *et al.*, 1986) e *Bacteroides fragilis* (Cuchural *et al.*, 1986).

Mais recentemente foi verificada a expressão de metalo- β -lactamases em diferentes espécies, incluindo *Bacillus cereus* (BcII) (Lim *et al.*, 1988), *Bacteroides fragilis* (CcrA) (Rasmussen *et al.*, 1990), *Aeromonas hydrophila* (CphA) (Massidda *et al.*, 1991), *Stenotrophomonas maltophilia* (L1) (Walsh *et al.*, 1994), *Serratia marcescens* (Osano *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1995), *Klebsiella pneumoniae* (Senda *et al.*, 1996a), *Aeromonas veronii* (Walsh *et al.*, 1998), *Pseudomonas aeruginosa* (Senda *et al.*, 1996b; Laraki *et al.*, 1999a; Lauretti *et al.*, 1999; Tsakris *et al.*, 2000), *Acinetobacter baumannii* (Brown *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 1996; Afzal-Shah *et al.*, 1998; Afzal-Shah *et al.*, 1999; Da Silva *et al.*, 1999; Riccio *et al.*, 2000), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB ou GOB-1) (Rossolini *et al.*, 1999), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1) (Bellais *et al.*, 2000), *Legionella (Fluribacter) gormanii* (FEZ-1) (Walsh *et al.*, 1994; Sanschagrín *et al.*, 1998; Boschi *et al.*, 2000), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B) (Simm *et al.*, 2001), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B) (Rossolini *et al.*, 2001), *Bacillus anthracis* (Bla2) (Chen *et al.*, 2003), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) (Naas *et al.*, 2003) e *Serratia fonticola* (Sfh-I) (Saavedra *et al.*, 2003). Nestes gêneros, as metalo- β -lactamases ocorrem naturalmente e são codificadas por genes cromossômicos (Bush, 1998; Walsh *et al.*, 2005).

As metalo- β -lactamases adquiridas são majoritariamente do tipo IMP, VIM, SPM, GIM e SIM; são enzimas codificadas por plasmídeos ou cromossomas, e estão normalmente associadas a integrons que transportam genes de resistência para outros antimicrobianos. Estas enzimas hidrolisam todos os antibióticos β -lactâmicos, à exceção do aztreonam (Poole, 2004).

A primeira enzima da série IMP mediada por um plasmídeo foi descrita por Watanabe e colaboradores (1991) num isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* no Japão, seguida pouco tempo depois pela descrição de uma metalo- β -lactamase em *Bacteroides fragilis* (Bandoh *et al.*, 1992; Bandoh *et al.*, 1993). Posteriormente foram identificadas outras bactérias resistentes aos carbapenemos nomeadamente da família *Enterobacteriaceae*, em particular *Serratia marcescens*, e várias espécies do género *Pseudomonas*, produtoras de metalo- β -lactamases em vários locais do Japão (Arakawa

et al., 1995; Ito *et al.*, 1995; Senda *et al.*, 1996a; Senda *et al.*, 1996b; Hirakata *et al.*, 1998). Durante muitos anos, a ocorrência de isolados produtores de IMP-1 foi restrita a esse país. Actualmente, IMP-1 tem sido encontrada em diversos países e em isolados de diferentes microrganismos como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* entre outros (Tysall *et al.*, 2002; Castanheira *et al.*, 2003; Gales *et al.*, 2003; Koh *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2004).

A primeira enzima da família IMP identificada na Europa foi descrita por Riccio e colaboradores, 2000, num isolado de *Acinetobacter baumannii* em Itália (IMP-2). Desde então a IMP tem sido descrita por todo o mundo, mais recentemente nos Estados Unidos e Austrália (Peleg *et al.*, 2004; Hanson *et al.*, 2006). Até agora foram descritas 24 tipos de enzimas pertencentes à família IMP (<http://www.lahey.org/studies>).

Em 1997, em Itália, é descrita uma nova metalo- β -lactamase associada a integrões, denominada VIM-1 (Lauretti *et al.*, 1999). Em simultâneo era descrita em França a enzima VIM-2 por Poirel e colaboradores (2000). Ambas as enzimas foram descritas em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, associadas a integrões de classe 1. Mais recentemente a enzima VIM-2 foi descrita num isolado ambiental de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Quinteira *et al.*, 2005).

A identificação da metalo- β -lactamase SPM-1 por Toleman e colaboradores, 2002, define uma nova família, com 35.5% de homologia com a IMP-1. A SPM-1 foi inicialmente descrita num isolado de *Pseudomonas aeruginosa* no Brasil, São Paulo.

Em 2002 é descrita, na Alemanha, uma nova β -lactamase dependente de zinco, GIM-1 (“German imipenemase”) (Castanheira *et al.*, 2004), com uma homologia de aproximadamente 30% com a VIM, 43% com a IMP e 29% com a SPM. Até ao momento esta enzima encontra-se restrita a este país (Queenan e Bush, 2007).

A família mais recente das carbapenemases de classe B, SIM, foi descrita na Coreia num isolado de *Acinetobacter baumannii* (Lee *et al.*, 2005). Esta enzima apresenta uma homologia de 64 a 69% com as enzimas da família IMP. A SIM-1 (“Seoul imipenemase”) tem sido frequentemente descrita em isolados de *Pseudomonas* sp. e de *Acinetobacter* sp. (Queenan e Bush, 2007).

OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho são abordar a importância da detecção de carbapenemases em estirpes bacterianas isoladas de animais selvagens de diferentes nichos ecológicos.

Para a concretização desta finalidade estabeleceram-se como objectivos específicos:

- Avaliar o perfil de susceptibilidade a diferentes grupos de antibióticos de estirpes bacterianas obtidas de animais selvagens;
- Estudar as estirpes resistentes a antibióticos β -lactâmicos incluindo aos carbapenemos;
- Identificar os isolados obtidos pelos sistemas de biotipificação numérica;
- Identificar geneticamente os isolados com resistência aos carbapenemos;
- Investigar as β -lactamases produzidas pelas bactérias estudadas recorrendo a amplificação de genes de resistência a carbapenemos, determinação do ponto isoeléctrico (pI) e determinação da sua incidência;
- Verificar o perfil de susceptibilidade a outros agentes antimicrobianos das estirpes bacterianas produtoras de carbapenemases.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Este estudo foi efectuado com amostras obtidas do Centro de Recepção Acolhimento e Tratamento de Animais Selvagens (CRATAS), projecto do Núcleo de estudo e Protecção do Ambiente (NEPA) sediado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD). Na tabela 3.1 encontra-se o número de amostras analisadas por espécie de animal em função da recolha.

Tabela 3.1 - Número de amostras utilizadas por espécie de animal

Nome comum do animal	Nome da espécie	Nº de amostras	
		Recolha A	Recolha B
Bufo real	<i>Bubo bubo</i>	1	1
Águia de asa redonda	<i>Buteo buteo</i>	5	13
Raposa	<i>Vulpes vulpes</i>	2	5
Coruja-do-mato	<i>Strix aluco</i>	13	5
Coruja-das-torres	<i>Tyto alba</i>	2	2
Papagaio	<i>Amazona aestiva</i>	1	1
Coelho	<i>Oryctologus cuniculus</i>	1	6
Gavião da Europa	<i>Accipiter nisus</i>	1	1
Milhafre	<i>Milvus migrans</i>	1	0
Águia cobreira	<i>Circaetus gallicus</i>	1	0
Cegonha braça	<i>Ciconia ciconia</i>	1	3
Arara	<i>Psittacidae</i>	1	0
Rouxinol	<i>Luscinia megarhynchos</i>	1	0
Corço	<i>Capreolus capreolus</i>	2	0
Ema	<i>Rhea iserica</i>	1	0
Pássaros	<i>Passeriformes</i>	1	0
Perdiz	<i>Perdix perdix</i>	1	1
Rato do campo	<i>Apodemus sylvaticus</i>	1	0
Esquilo	<i>Sciurus vulgaris</i>	4	1
Andorinhão	<i>Apus apus</i>	1	0
Mocho galego	<i>Athene noctua</i>	2	0
Cágado	<i>Mauremys leprosa</i>	0	1
Cobra	<i>Colubridae</i>	1	2
Rola brava	<i>Streptopelia turtur</i>	0	1
Codorniz	<i>Coturnix coturnix</i>	0	6
Grifo	<i>Gyps fulvus</i>	0	1
Açor	<i>Accipiter gentilis</i>	0	4
Gineta	<i>Genetta genetta</i>	0	2
Javali	<i>Sus scrofa</i>	0	4
Morcego	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	0	9
Piriquito	<i>Melopsittacus undulatus</i>	0	1
Pavão	<i>Pavo cristatus</i>	0	1
Garça-real	<i>Ardea cinérea</i>	0	2
Falco	<i>Falco peregrinus</i>	0	1
Pombo	<i>Columba livia</i>	0	12
Veado	<i>Cervus elaphus</i>	1	9

3.2 RECOLHA DAS AMOSTRAS

A recolha incidiu num total de 140 amostras de animais selvagens, de acordo com a metodologia descrita do quadro 3.1.

Quadro 3.1 - Recolha das amostras

1. Com uma zaragatoa retire as fezes do animal;
2. Coloque a amostra num tubo de ensaio, fechado, que contenha B.H.I (Anexos I- Meio 1);
3. Coloque o tubo de ensaio numa estufa a 30°C durante cerca de 24 horas.

3.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS EM LABORATÓRIO

As amostras biológicas deram entrada no laboratório em meio B.H.I líquido, (Anexos I- Meio 1). Seguidamente as amostras foram inoculadas em meio de cultura sólido (Quadro 3.2). Foi utilizado o meio sólido G.S.P (Anexos I - Meio 2), meio selectivo e diferencial para os géneros *Aeromonas* e *Pseudomonas* para obtenção de uma cultura inicial.

Quadro 3.2 - Procedimento para obtenção de cultura inicial

1. Com uma zaragatoa esterilizada semear uma placa de G.S.P (Anexos I - Meio 2) com a mistura do B.H.I (Anexos I - Meio 1);
2. Incubar a placa numa estufa a 30°C durante 24 horas, numa posição invertida.

3.4 ISOLAMENTO DE ESTIRPES

O procedimento para a obtenção de cultura pura foi de acordo com o referido no quadro 3.3.

Quadro 3.3 - Obtenção de cultura pura

1. Com a ansa esterilizada, semear por esgotamento numa placa de G.S.P o inóculo;
2. Levar a ansa ao rubro e deixar arrefecer;
3. Fazer três estrias paralelas, com a ansa a partir do esgotamento;
4. Rodar a placa e fazer novas estrias semelhantes e a partir das anteriores;
5. Levar novamente a ansa a chama do bico de Busen e deixar arrefecer;
6. Reproduzir os passos 4. e 5. até esgotar o espaço do meio de cultura, sem tocar no esgotamento inicial;
7. Incubar a placa numa estufa a 30°C cerca da 24 horas, numa posição invertida;
8. Repicar as colónias isoladas, utilizando o mesmo procedimento;
9. Caso não se obtenha cultura pura, repetir o procedimento, a partir de uma colónia perfeitamente individualizada, até se obter uma cultura pura.

3.5 CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As estirpes obtidas foram conservadas de acordo com a metodologia descrita no quadro

3.4. Sempre que necessário semearam-se as estirpes em meios adequados.

Quadro 3.4 - Conservação dos isolados bacterianos

1. Inocular a cultura no meio de B.H.I (Anexos I - Meio 1);
2. Incubar a 30°C durante cerca de 24 horas;
3. Posteriormente pipetar 300µl de glicerol a 70% para o criotubo;
4. Finalmente, conservar as alíquotas de B.H.I. com glicerol a 15% a -70°C.

3.6 PROVAS MORFO-FISIOLÓGICAS

3.6.1 Coloração de Gram

A coloração diferencial, ou coloração de Gram, cuja metodologia se encontra descrita no quadro 3.5, é um método utilizado para distinguir dois grupos de bactérias: bactérias de Gram positivo e bactérias de Gram negativo.

Quadro 3.5 - Procedimento de coloração pelo método de Gram

1. **Esfregaço:**
 - Numa lâmina de microscópio limpa colocar uma gota de soro fisiológico;
 - Retirar com uma ansa esterilizada uma pequena porção de cultura;
 - Espalhar o inóculo, numa camada fina;
 - Deixar secar ao ar, ou numa chama muito fraca;
2. **Fixação:**
 - Colocar a lâmina à chama, a uma altura a que a mão suporte o calor;
 - Passar a lâmina pela chama, cerca de três vezes e deixe arrefecer;
3. **Corante inicial** – violeta de metilo (1 minuto);
4. **1º Lavagem** – água;
5. **Mordente** – lugol (30 segundos);
6. **Diferenciação** – álcool;
7. **2º Lavagem** – água;
8. **Corante de contraste** – vermelho neutro (1 a 2 minutos);
9. **3º Lavagem** – água;
10. **Secar** – entre duas folhas de papel de filtro;
11. **Observar** – objectiva de 100 X com óleo de imersão.

3.6.2 Prova da citocromo-oxidase

A oxidase é uma enzima importante no sistema de transporte de electrões, durante a respiração aeróbia. Esta enzima catalisa a oxidação de um citocromo, reduzido pelo oxigénio molecular, originando uma molécula de água e uma de citocromo-oxidase.

A prova da oxidase (Quadro 3.6) permite diferenciar as bactérias de Gram negativo em duas famílias: as não *Enterobacteriaceae* oxidase positiva e as *Enterobacteriaceae*, oxidase negativa.

Para a realização desta prova foi preparada uma solução a 1% de dicloro N-tetrametil p-fenilenodiamina-Reagente oxidase. Esta solução deve ser preparada no momento, devendo proteger-se da luz para evitar a sua oxidação.

Quadro 3.6 - Prova da citocromo - oxidase

1. Colocar uma tira de papel de filtro sobre a tampa de uma placa de Petri;
2. Aplicar duas a três gotas do reagente oxidase sobre a tira;
3. Com uma pipeta de Pasteur retirar uma pequena porção de colónia e colocar sobre a tira de papel de filtro;
4. Se houver mudança de cor (junto à zona em que se colocou a porção de colónia) a reacção é positiva.

3.6.3 Prova da catalase

A actividade da catalase manifesta-se na maior parte das bactérias aeróbias, mas apenas em algumas anaeróbias. A catalase é uma enzima hemoproteica que contém ferro e decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água e oxigénio (Quadro 3.7).

Quadro 3.7 - Prova da catalase

1. Numa lâmina desengordurada e passada previamente ao bico de Busen, colocar uma gota de água oxigenada;
2. De um meio sem sangue, recolher uma colónia e colocar sobre a gota de água oxigenada;
3. Ao verificar efervescência diz-se que a reacção é positiva, ou seja, revela-se a produção de catalase.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

A identificação das estirpes utilizadas neste trabalho foi realizada através de métodos de biotipificação numérica e de sequenciação.

3.7.1. Biotipificação numérica

A identificação das estirpes foi efectuada pelos sistemas de biotipificação numérica, API 20E (bioMérieux 20 100) e API 20NE (bioMérieux 20 050).

3.7.1.1 Sistema de identificação numérica API 20E (bioMérieux 20 100)

O API 20E é um sistema padronizado para a identificação das *Enterobacteriaceae* e outros bacilos Gram negativos não fastidiosos que engloba 20 testes bioquímicos. A metodologia utilizada, quadro 3.8, foi o procedimento definido pelo fabricante.

Quadro 3.8 - Sistema numérico API 20E (bioMérieux 20 100)

1. Preparar a câmara de incubação, colocando aproximadamente 5ml de água destilada estéril nos alvéolos para criar uma atmosfera húmida. Após retirar a galeria do invólucro hermético, coloca-la na câmara;
2. Para preparação do inóculo deve abrir uma ampola contendo 5ml de soro fisiológico estéril. Com uma pipeta colher uma única colónia bem isolada do meio. Efectuar uma suspensão bacteriana homogeneizando cuidadosamente as bactérias no meio;
3. Encher os tubos e cúpulas dos testes CIT, VP e GEL com a suspensão bacteriana utilizando a pipeta que serviu para a colheita;
4. De seguida encher unicamente os tubos (e não as cúpulas) das restantes provas bioquímicas;
5. Criar uma anaerobiose nos testes ADH, LDC, ODC, H₂S e URE enchendo as cúpulas com óleo de parafina;
6. Fechar a caixa de incubação e levar a incubar a 30°C durante cerca de 24 horas.

3.7.1.2 Sistema de identificação numérico API 20NE (bioMérieux 20 050)

O sistema numérico API 20NE é utilizado na identificação de bacilos de Gram negativo não fastidiosos que não pertencem à família das *Enterobacteriaceae*, que combina 8 testes convencionais e 12 testes de assimilação. A metodologia utilizada encontra-se descrita no quadro 3.9.

Quadro 3.9 - Sistema numérico API 20NE (bioMérieux 20 050)

1. Preparar a câmara de incubação, colocando aproximadamente 5ml de água destilada nos alvéolos para criar uma atmosfera húmida. Após retirar a galeria do invólucro hermético, coloca-la na câmara;
2. Para preparação do inóculo deve abrir uma ampola de soro fisiológico (NaCl 0,85%), ou utilizar um tubo que contenha 2ml da mesma solução. Realizar a suspensão com uma concentração correspondente a 0,5 da escala de McFarland, retirando 4 ou 5 colónias de uma cultura pura;
3. Encher os tubos (e não as cúpulas) dos testes NO₃ a ONPG com a suspensão, evitando a formação de bolhas de ar. Deve ter o cuidado de colocar a ponta da pipeta junto à parede da cúpula;
4. Abrir o meio auxiliar (API AUX Meio) (Anexos I- meio 3) e transferir 200µl (4 a 8 gotas) da suspensão bacteriana. Homogeneizar com a pipeta, evitando formação de bolhas de ar;
5. Encher os tubos e cúpulas desde GLU até PAC, para que o líquido fique horizontal ou convexo (nunca côncavo);
6. Colocar parafina líquida nas cúpulas dos substratos GLU, ADH e URE;
7. Fechar a câmara de incubação e colocar a 30°C durante 24-48 horas.

3.7.2 Identificação genética

Procedeu-se à identificação das estirpes por métodos genéticos. A identificação genética dos isolados realizou-se no Laboratório *Molecular Diagnostics Center* (MDC), em Alicante (Espanha). A metodologia utilizada na sequenciação foi a implementada no laboratório.

3.7.2.1 Extracção de DNA total

Para a extracção de DNA a partir de uma cultura pura dos isolados utilizou-se a metodologia descrita no quadro 3.10.

Quadro 3.10 - Metodologia de extracção de DNA total, de estirpes bacterianas

1. Num tubo de 1,5 ml suspender em 100 µl de TE uma colónia de cultura recente;
2. De seguida adicionar 200 µl de chelex previamente preparado na concentração de 20% (Bio-Rad);
3. Agitar no vortex durante cerca de um minuto;
4. Submeter a mistura a uma sucessão de três ciclos de choques térmicos, alternando 10 minutos de aquecimento a 95 °C com um período de 10 minutos de congelação a -20°C;
5. Agitar novamente o tubo no vortex;
6. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 r.p.m.;
7. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e armazenar a -20°C.

3.7.2.2 Amplificação de DNA por reacção de PCR

Para a amplificação dos genes *gyrB* e 16S rDNA utilizaram-se os oligonucleótidos descritos no quadro 3.11.

Quadro 3.11 - Oligonucleótidos utilizados em reacção de PCR

	<i>Posição*</i>	<i>Sequência (5'---3')</i>	<i>Referência</i>
<i>gyrB</i> 3F	334/354	TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT	Yáñez <i>et al.</i> , 2003
<i>gyrB</i> 14R	1464/1444	TTG TCC GGG TTG TAC TCG TC	Yáñez <i>et al.</i> , 2003
16S 0F	8/27	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 1999
16S 15R	1492/1510	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Martínez-Murcia <i>et al.</i> , 1999

Nota: * posição segundo numeração de *E. coli* (Huang, 1996)

A mistura da PCR foi realizada para um volume final de 50 µl, contendo 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 75 mM de Tris HCl (pH 9.0), 20 mM de (NH₄)₂SO₄, 1 µl de DNA genómico, 2,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleótido e 1 U Taq polimerase (BIOTOOLS).

As misturas foram submetidas a diferentes condições de amplificação conforme os genes a amplificar. Para a amplificação do rDNA 16S a mistura foi submetida inicialmente à temperatura de 94 °C durante um período de 5 minutos para desnaturação, de seguida foi submetida a 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C durante 15 segundos, hibridação a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 1 minuto e 30 segundos). Para finalizar submeteu-se a mistura a um ciclo de extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Para a amplificação do gene *gyrB* foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial durante 5 minutos à temperatura de 94 °C, 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C durante 15 segundos, hibridação a 55 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 45 segundos). Para finalizar submeteu-se a mistura a um ciclo de extensão final a 72 °C por um período de 5 minutos.

Os resultados foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1%, preparado com Tris-acetato-EDTA (TAE), incorporado com brometo de etídio (5 µg/ml). Analisaram-se, para tal, 4 µl do produto de PCR de cada amostra, misturando com 2 µl

de tampão de carga e aplicando uma voltagem de 6 V/cm. Foram visualizados com ultra-violetas de 312 nm de comprimento de onda e as imagens foram registadas com o equipamento de análise de imagens Gel Doc Mega 5 (Biosystematica).

3.7.2.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com o “Kit” QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen), seguindo o procedimento aconselhado pelo fabricante. A metodologia utilizada encontra-se descrita no quadro 3.12.

Quadro 3.12 - Protocolo de purificação de produtos de PCR

1. Num tubo de 1,5 ml colocar 250 µl de Buffer PB e adicionar o produto da PCR (50 µl);
2. Colocar a mistura numa coluna QIAquick;
3. Centrifugar 1 minuto a 13000 r.p.m.;
4. Deitar fora o que passa para o tubo colector;
5. Para lavar, adicionar 750 µl de Buffer PE à coluna;
6. Centrifugar 1 minuto a 13000 r.p.m.;
7. Deitar fora e centrifugar novamente 1 minuto a 13000 r.p.m.;
8. Colocar a coluna num tubo de 1,5 ml;
9. Para eluir o DNA, adicionar 30 µl de H₂O M.Q.;
10. Centrifugar novamente e guardar a -20 °C.

3.7.2.4 Sequenciação

Os produtos de amplificação purificados foram preparados com o kit Big Dye® *Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), segundo recomendações do fabricante. A reacção de sequenciação foi preparada para um volume final de 10 µl, adicionando-se 4 µl da solução “Premix”; 4 µl de DNA genómico e 2 µl de primer a 2 µM. No quadro 3.13 estão descritos os oligonucleótidos utilizados.

Quadro 3.13 - Oligonucleótidos utilizados nas reacções de sequenciação

	<i>Posição*</i>	<i>Sequência (5'---3')</i>	<i>Referência</i>
<i>gyrB</i> 3F	334/354*	TCC GGC GGT CTG CAC GGC GT	Yáñez <i>et al.</i> , 2003
<i>gyrB</i> 7F	792/812*	GGG GTC TAC TGC TTC ACC AA	Yáñez <i>et al.</i> , 2003
16S 0F	8/27 [#]	AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG	Martinez-Murcia <i>et al.</i> , 1999
16S 9R	926/908 [#]	CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT	Martinez-Murcia <i>et al.</i> , 1999
16S 15R	1492/1510 [#]	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	Martinez-Murcia <i>et al.</i> , 1999

Nota: * posição segundo numeração de *E. coli* (Huang, 1996)
[#] posição segundo numeração de *E. coli* (Stern *et al.*, 1988)

A mistura foi submetida a uma sucessão de 25 ciclos. As condições para cada ciclo foram: desnaturação a 96 °C por um período de 10 segundos, hibridação a 50 °C durante 5 segundos e extensão a 60 °C por um período de 4 minutos.

Os produtos da reacção de sequenciação foram precipitados conforme a metodologia descrita no quadro 3.14.

Quadro 3.14 - Protocolo de precipitação dos produtos de sequenciação

1. Num tubo de 1,5 ml colocar: 2,5 µl EDTA (125 mM) e 30 µl Etanol a 100%;
2. Adicionar os 10 µl da reacção de sequenciação, misturar por inversão e deixar à temperatura ambiente por um período de 15 minutos;
3. Centrifugar 20 minutos a 14000 r.p.m. à temperatura de 4 °C;
4. Eliminar a solução de etanol e EDTA;
5. Adicionar 100 µl de etanol a 70%;
6. Centrifugar durante 2 minutos a 14000 r.p.m. a 4 °C e eliminar na totalidade a solução de etanol;
7. Secar o pellet (10 minutos no Concentrator – Vacufuge, Eppendorf);
8. Armazenar o pellet seco a -20 °C.

Para a ressuspensão do pellet adiciona-se 20 µl de formamida desionizada, repousa 5-10 minutos à temperatura ambiente, utiliza-se o vortex durante alguns minutos e centrifuga-se brevemente. De seguida carrega-se a placa do sequenciador automático ABI 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems).

O serviço de sequenciação foi efectuado no Laboratório de I&D, Molecular Diagnostic Center (MDC), Alicante, Espanha (<http://www.mdc-bt.com>).

3.7.2.5 Análise de seqüências e construção dos dendogramas

As seqüências nucleotídicas obtidas foram analisadas pelo programa Chromas lite versão 2.0. O alinhamento foi realizado com o programa Clustal X, versão 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). As árvores evolutivas construíram-se pelo método Neighbour-Joining (Saitou e Nei, 1987) com o programa MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis- versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

3.8 DETERMINAÇÃO *in vitro* DA SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

3.8.1 Método de difusão em disco: técnica de Kirby-Bauer

A susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados foi determinada pela técnica de Kirby-Bauer (Quadro 3.15), com os seguintes discos de antibióticos (Oxoid): **β -lactâmicos:** (a) Penicilinas: Amoxicilina (AML₁₀); Amoxicilina / Ácido clavulânico (AMC₃₀); Piperacilina (PRL₁₀₀), Piperacilina / Tazobactan (TZP₁₁₀), Ticarcilina (TIC₇₅), Ticarcilina / Ácido clavulânico (TIM₈₅); (b) Cefalosporinas: Cefalotina (KF₃₀), Cefoxitina (FOX₃₀); Cefotaxima (CTX₃₀), Cefoperazona (CFP₃₀), Ceftazidima (CAZ₃₀), Ceftriaxona (CRO₃₀), Cefepima (FEP₃₀); (c) Monobactâmicos: Aztreonamo (ATM₃₀); (d) Carbapenemos: Imipenemo (IPM₁₀); **Aminoglicosídeos:** Gentamicina (CN₁₀), Canamicina (K₃₀), Tobramicina (TOB₁₀), Amicacina (AK₃₀), Estreptomicina (S₁₀); **Tetraciclina:** Tetraciclina (TE₃₀); **Quinolonas:** Ácido Nalidíxico (NA₃₀), Ciprofloxacina (CIP₅); **Macrólidos:** Eritromicina (E₁₅); **Fenicois:** Cloranfenicol (C₃₀); **Fosfomicina (FOS₅₀); Sulfamidas:** Co-trimoxazol (SxT₂₅).

O antibiograma foi efectuado segundo as normas de CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2006, (ex: NCCLS), classificando a estirpe de acordo com o diâmetro do halo de inibição observado, nas categorias sensível (S), intermédia (I) ou resistente (R).

Quadro 3.15 - Técnica de difusão em agar com discos de antibióticos

1. Preparar uma suspensão bacteriana de cada estirpe em estudo a partir de 3 a 4 colónias em soro fisiológico estéril. A suspensão deve ter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland;
2. Mergulhar uma zaragatoa na suspensão bacteriana retirando o excesso;
3. Semear em placas de agar Mueller-Hinton (Anexos I - Meio 4);
4. Aplicar os discos dos antibióticos sobre a superfície do meio de cultura, após a secagem do inóculo;
5. Incubar a 37°C, durante 18 horas;
6. Com uma craveira medir os diâmetros dos halos de inibição para cada antibiótico.

3.8.2 Método de difusão em agar com tiras (E-test)

Para a determinação da produção de β -lactamases de espectro alargado, foi utilizado o método de difusão em agar com tiras ESBLs - cefepima /cefepima+ ácido clavulânico (PM/ PML), de acordo com a metodologia descrita no quadro 3.16.

Quadro 3.16 - Técnica de difusão em agar com tiras E-test

1. Preparar uma suspensão bacteriana de cada estirpe em soro fisiológico estéril. A suspensão deve ter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland;
2. Mergulhar uma zaragatoa na suspensão bacteriana retirando o excesso;
3. Semear em placas de agar Mueller-Hinton (Anexos I – Meio4);
4. Aplicar as tiras sobre a superfície do meio de cultura, após a secagem do inóculo;
5. Incubar a 37°C, durante 18 horas;

3.8.3 Teste de sinergismo do duplo disco

O teste de sinergismo do duplo disco (Quadro 3.17) baseia-se na detecção de sinergismo entre as cefalosporinas e o ácido clavulânico, para a detecção de β -lactamases de espectro alargado.

Quadro 3.17 - Teste de sinergismo do duplo disco

1. Preparar uma suspensão bacteriana de cada estirpe em estudo em soro fisiológico estéril. A suspensão deve ter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland;
2. Mergulhar uma zaragatoa na suspensão bacteriana retirando o excesso;
3. Semear em placas de agar Mueller-Hinton (Anexos I – Meio4);
4. Posicionar os discos de CAZ, ATM e CTX a 30mm do disco de AMC;
5. Incubar a 37°C, durante 18 horas;
6. Com uma craveira medir os diâmetros dos halos de inibição de crescimento para cada antibiótico.

3.9 DETECÇÃO DE β -LACTAMASES**3.9.1 Caracterização das β -lactamases**

O ponto isoelétrico (pI) das β -lactamases em estudo foi determinado nos extractos enzimáticos por focagem isoelétrica no Sistema Phast System- Pharmacia (Houvinen, 1988).

3.9.1.1 Preparação dos extractos enzimáticos

Os extractos brutos das estirpes foram obtidos seguindo a metodologia descrita por Arstila *et al.*, 1993, e Peixe, 1996 (Quadro 3.18).

Quadro 3.18 - Preparação dos extractos enzimáticos

1. As estirpes são cultivadas em meio de B.H.I (Anexos I- Meio1) a 37°C, durante a noite, obtendo-se uma cultura em fase exponencial (18 h);
2. Posteriormente transferir 1 ml desta cultura para 50 ml de T.S.B (Anexos I- Meio4) e incubar a 37°C com agitação, durante 3 a 4 horas;
3. As culturas assim obtidas são centrifugadas a 5000 r.p.m a 4°C, durante 15 minutos. Após rejeitar o sobrenadante as células sedimentadas são lavadas em soro fisiológico (10 ml), ressuspensas e centrifugadas novamente;
4. Os sedimentos obtidos, após rejeitar o soro fisiológico são ressuspensos em 1 ml de água destilada;
5. As suspensões obtidas são sonicadas em gelo, durante 2 minutos, com intervalos de 30 segundos, com um sonicador Labsonic 200 a 300 MHZ;
6. Os sonicados são transferidos para tubos Eppendorf e centrifugados a 12000 r.p.m a 4°C, durante 15 minutos;
7. Os sobrenadantes obtidos são congelados a -20°C até à sua utilização.

3.9.1.2 Prova do nitrocefim

O nitrocefim é uma cefalosporina cromogénica sem interesse terapêutico, mas de grande utilidade como reagente na detecção de β -lactamases de centro serina. Esta cefalosporina muda de cor, após hidrólise do anel β -lactâmico pela acção de β -lactamases. Colocar 10 μ l de extracto enzimático num eppendorf esterilizado e aplicar 10 μ l de nitrocefim, caso haja alteração da cor a reacção é positiva.

3.9.1.3 Determinação do ponto isoeléctrico (pI) das β -lactamases

São aplicados 5 μ l dos extractos brutos em géis comerciais de poliacrilamida, com anfóliticos de gradientes de pH de 3 a 9 (Phastgel 3-9, Pharmacia). Em cada gel, paralelamente aos extractos em estudo, usam-se como padrões de ponto isoeléctrico, extractos brutos de estirpes padrão produtoras de β -lactamases de pI conhecido, nomeadamente TEM-1 (5,4) e SHV-5 (8,2).

Após a focagem isoeléctrica no sistema Phast System a visualização das bandas correspondentes às β -lactamases presentes no gel é efectuada por adição de 100 μ l de nitrocefim (Glaxo Farmacêutica) numa concentração stock de 100 μ M.

3.9.1.4 Pesquisa fenotípica de carbapenemases por um ensaio microbiológico

Realizou-se um bioensaio, das estirpes resistentes aos carbapenemos e das estirpes pertencentes ao género *Aeromonas*, para verificar se os isolados possuíam enzimas com actividade hidrolítica sobre o imipenemo (carbapenemo). A metodologia utilizada para a realização do bioensaio encontra-se descrita no quadro 3.19.

Quadro 3.19 - Bioensaio para detecção de enzimas

1. Numa placa de Mueller-Hinton (Anexos I- Meio 3) inocular uma estirpe sensível ao imipenemo (*Escherichia coli* ATCC 25922);
2. Colocar discos comerciais de imipenemo (IPM 10µg) impregnado com 10 e 20 µl de extracto enzimático bruto das β-lactamases, na estufa a 37°C durante 15 minutos;
3. Posteriormente colocar os discos de imipenemo (10µg) + extractos (10µg); imipenemo (10µg), sobre a superfície do agar Mueller-Hinton previamente inoculado com a *E coli* ATCC 25922;
4. Colocar na estufa a 37°C durante cerca de 18 horas. Após incubação observar os resultados tentando verificar se o extracto da estirpe em estudo inactiva ou não o imipenemo.

3.9.2 Pesquisa genotípica de β-lactamases

Os isolados resistentes ao imipenemo foram seleccionados para se proceder à pesquisa dos genes *bla*_{CphA}, *bla*_{IMP-type}, *bla*_{VIM-type} e *bla*_{OXA-type}, genes que codificam para as carbapenemases CphA, IMP, VIM, e OXA, respectivamente. Adicionalmente estes genes foram também pesquisados nos isolados do género *Aeromonas*.

Para além dos genes que codificam para carbapenemases, foram pesquisados os genes *bla*_{TEM-type}, *bla*_{SHV-type}, *bla*_{CTX-M-type}, *bla*_{MOX} e *bla*_{FOX}, genes que codificam para β-lactamases de espectro alargado.

3.9.2.1 Amplificação de genes *bla*

Na reacção de PCR utilizou-se o DNA total extraído, pelo método descrito no ponto 3.7.2.1, dos isolados resistentes ao imipenemo e dos isolados do género *Aeromonas*. Foram pesquisados os genes *bla*_{CphA}, *bla*_{IMP-type}, *bla*_{VIM-type}, *bla*_{OXA-type}, *bla*_{TEM-type}, *bla*_{SHV-type}, *bla*_{CTX-M-type}, *bla*_{MOX} e *bla*_{FOX}.

A mistura da PCR foi realizada para um volume final de 50 µl, contendo 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 75 mM de Tris HCl (pH 9.0), 20 mM de (NH₄)₂SO₄, 1 µl de DNA genómico, 2,5 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada oligonucleótido (sequências não publicadas, Martinez-Murcia *et al.*, 2008), e 1 U Taq polimerase (BIOTOOLS).

As reacções de amplificação para a pesquisa dos genes foram efectuadas de acordo com as condições de amplificação referidas para o gene *gyrB* (Ponto 3.8.2.2).

Os produtos de reacção de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose (1%), preparado com TAE e brometo de etídio (5µg/ml). O DNA amplificado foi visualizado num transiluminador de ultra-violeta de 312nm de comprimento de onda.

Os produtos amplificados por PCR destinados a sequenciar foram purificados pelo “Kit” QIA quick PCR Purification kit (Qiagen), a metodologia utilizada encontra-se descrita no quadro 3.12.

A sequências nucleotídicas constituintes do DNA resultantes dos produtos de PCR purificados foram determinados com o kit Big Dye® *Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), a metodologia utilizada foi a recomendada pelo fabricante (Ponto 3.7.2.4).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS UTILIZADOS

Para a obtenção dos isolados necessários à elaboração deste trabalho foram realizados dois períodos de recolha de amostras, já referidos na tabela 3.1 do capítulo material e métodos. As sementeiras foram realizadas em G.S.P (Anexos I - Meio 2), um meio selectivo e diferencial para os géneros *Aeromonas* e *Pseudomonas*, tendo-se seleccionado os isolados de Gram negativo.

No período A, que decorreu entre os meses de Março a Junho de 2007, amostraram-se 45 animais selvagens, de 23 espécies. Deste período de quatro meses obteve-se um total de 197 isolados. O período B decorreu nos meses de Setembro a Novembro de 2007. Neste período o trabalho incidiu sobre 95 amostras de 26 espécies, tendo-se obtido um total de 483 isolados. A colecção de isolados bacterianos obtidos foi de um total de 680 isolados. Destes foram estudados 456 isolados de Gram negativo, obtidos no período A (n=131) e no período B (n=325).

Às estirpes isoladas foi atribuída uma referência constituída por letras e números. A primeira letra corresponde à sementeira inicial (eram feitas 2 placas iniciais de modo a obter o máximo de diversidade possível) e o número que se segue à letra corresponde ao número de colónias retiradas da mesma placa. Caso a cultura não estivesse pura eram retiradas novas colónias às quais eram atribuídas letras minúsculas. Este procedimento era repetido até se obter uma cultura pura. As amostras que foram identificadas por sequenciação do gene *gyrB* e 16S rDNA, nas instalações do laboratório *Molecular Diagnostics Center* (MDC) foram depositadas na colecção da instituição, pelo que lhes foi atribuído um número de referência dessa colecção.

Para a realização deste estudo foram seleccionados os isolados de Gram negativo, resistentes aos carbapenemos, e os isolados de Gram negativo com colónias presuntivas de *Aeromonas*. Na tabela 4.1 pode-se observar a descrição dos isolados utilizados neste trabalho e a sua respectiva referência, bem como a referência MDC.

Tabela 4.1 – Isolados bacterianos utilizados neste trabalho

RECOLHA	ORIGEM/ AMOSTRA	ESTIRPES ISOLADAS
A	Veado AS006	C ₂ (MDC1276), C ₃ b ₁ (MDC180), C ₃ c ₁ (MDC182), C ₃ c ₂ (MDC190), C ₃ d ₂ (MDC193)
	Raposa AS008	A ₁ (MDC1277), A ₂ (MDC1278)
	Águia de asa redonda AS009	A ₁ (MDC1279)
B	Coruja do mato AS017	17 A ₃ a (MDC2447)
	Emu AS027	A ₂ (MDC1280), A ₃ a (MDC1281)
	Esquilo AS036	A ₂ a ₁ B (MDC2485), B ₁ a ₂ (MDC2486)
	Esquilo AS044	A ₂ a ₁ (A) (MDC2487), A ₂ a ₁ (B) (MDC2488), A ₂ A ₁ (C) (MDC2489), B ₂ b ₁ A (MDC2490)
	Águia Cobreira AS070	Gsp ₁ (MDC2491)
	Veado AS115	A ₂ Gsp ₁ (MDC2492)
	Veado AS117	Gsp ₂ A (MDC2493), Gsp ₂ C ₁ (MDC2494)
	Veado AS119	Gsp ₁ C ₁ (MDC2495)

4.2 PROVAS MORFO-FISIOLÓGICAS

Do total das amostras obtidas no período A foram isoladas espécies bacterianas pertencentes a vários gêneros, verificando-se que o número de isolados de Gram negativo era de 131 e os isolados de Gram positivo era de 66.

Em relação aos isolados de Gram negativo observamos que estes pertenciam a dois grupos: *Enterobacteriaceae* e não *Enterobacteriaceae*. Foi verificada a incidência de 61 isolados pertencentes às *Enterobacteriaceae* (29 catalase positiva e 32 catalase negativa), e 70 isolados pertencentes às não *Enterobacteriaceae* (30 catalase positiva e 40 catalase negativa).

Do total das amostras recolhidas no período B foram obtidos 483 isolados bacterianos, verificando-se, um número de estirpes de Gram negativo de 325 isolados, e 158 positivo de Gram negativo.

Relativamente aos isolados de Gram negativo, obtidos no período B, verificou-se que a grande maioria pertencia à família das *Enterobacteriaceae* com 290 isolados (150 catalase positiva e 140 catalase negativa) e 35 isolados pertencentes as não *Enterobacteriaceae* (15 apresentavam catalase positiva e 20 catalase negativa). No total foram isoladas 680 estirpes, 456 estirpes de Gram negativo e 224 estirpes de Gram positivo. De entre os isolados de Gram negativo a maioria pertence à família das *Enterobacteriaceae*, com oxidase negativa, como se pode observar na figura 4.1.

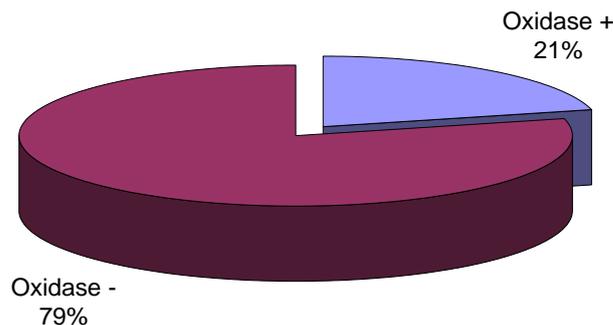


Figura 4.1 - Percentagem de isolados bacterianos pertencentes às *Enterobacteriaceae* (oxidase negativa) e às não *Enterobacteriaceae* (oxidase positiva).

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

4.3.1 Sistema de identificação numérico API 20E (bioMérieux 20 100)

Para as estirpes AS027A₂ (MDC 1280) e AS027A_{3a} (MDC 1281) pertencentes às *Enterobacteriaceae*, isoladas de uma ema, foi utilizado o método de biotipificação numérico API 20E, como meio complementar de identificação. Na tabela 4.2 estão representados os perfis bioquímicos obtidos, não tendo sido possível identificar os isolados.

Tabela 4.2 - Provas bioquímicas do API20E (bioMérieux 20 100)

Referência	Provas Bioquímicas																			
	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
AS027A ₂ (MDC 1280)	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AS027A _{3a} (MDC 1281)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: ONPG - -galactosidase; ADH - arginina; LDC - lisina; ODC - ornitina; CIT - citrato; H₂S - tiosulfato de sódio; URE - ureia; TDA - triptofano; IND - indol; VP - piruvato de sódio; GEL - gelatina; GLU - glucose; MAN - manitol; INO - inositol; SOR - sorbitol; RHA - ramnose; SAC - sacarose; MEL - melibiose; AMY - amígdalina; ARA - arabinose; (+) prova positiva; (-) prova negativa.

4.3.2 Sistema de identificação numérico API 20NE (bioMérieux 20 050)

Para as estirpes de Gram negativo, que não pertencem à família das *Enterobacteriaceae* a identificação foi efectuada utilizando o sistema de identificação API 20NE (tabela4.3).

Tabela 4.3 - Provas bioquímicas do API20NE (bioMérieux 20 050)

Referência	Provas bioquímicas																				IDENTIFICAÇÃO
	NO ₃	TRP	GLU*	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	
AS006 C ₂ (MDC1276)	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	S/ identificação
AS006 C _{3b1} (MDC108)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. hydrophila</i>
AS006 C _{3c1} (MDC182)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. hydrophila</i>
AS006 C _{3c2} (MDC190)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. sobria</i>
AS006 C _{3d1} (MDC193)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. sobria</i>
AS008 A ₁ MDC1277	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>P. fluorescens</i>
AS017 A _{3a} MDC2447	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. hydrophila</i>
AS036 A _{2a1B} MDC2485	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>A. hydrophila</i>
AS036 B _{1a2} MDC2486	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>A. hydrophila</i>
AS044 A _{2a1} MDC2487	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. hydrophila</i>
AS044 B _{2a1A} MDC2490	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. hydrophila</i>
AS070 GSP ₁ MDC2491	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. sobria</i>
AS115 A ₂ GSP ₁ MDC2492	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>A. hydrophila</i>
AS117 GSP _{2A} MDC2493	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	<i>A. hydrophila/</i> <i>A. caviae</i>
AS117GSP _{2c1} MDC2494	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	<i>A. hydrophila/</i> <i>A. caviae</i>
AS119 GSP _{1c1} MDC2485	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	<i>A. sobria</i>

Legenda: NO₃ - nitrato; TRP - triptofano; GLU*- glucose em aerobiose; ADH - arginina; URE - ureia; ESC - esculina; GEL - gelatina; PNG - p-nitro-fenil-β-D-galactopironosido; GLU - glucose; ARA - arabinose; MNE - manose; MAN - manito; NAG - N-acetil-glucosamina; MAL - maltose; GNT - gluconato; CAP - caprato; ADI - adipato; MLT -malato; CIT - citrato; PAC - fenilacetato; OX- oxidação; (+) prova positiva; (-) prova negativa.

Pela análise da tabela 4.3, anteriormente referida, verifica-se que a maioria dos isolados (n=12) pertencem ao género *Aeromonas*, tendo sido identificadas duas espécies, nomeadamente *Aeromonas hydrophila* (n=8) e *Aeromonas sobria* (n=4).

Nos isolados AS117 GSP₂A (MDC2493) e AS117 GSP₂C₁ (MDC2494), isolados bacterianos obtidos de uma amostra de veado, os perfis bioquímicos indicam duas identificações possíveis *Aeromonas hydrophila*/*Aeromonas caviae*. Com o sistema numérico API 20NE não foi possível identificar o isolado AS006 C₂ (MDC1276), isolado obtido a partir a amostra de veado.

Relativamente aos isolados identificados como pertencentes ao género *Aeromonas*, os resultados que mais se destacam, correspondem às provas do nitrato, triptofano, glucose em aerobiose, gelatina, manose, manito, N-acetil-glucosamina, gluconato e malato com resultados positivos, e as provas da ureia, adipato e fenilacetato com resultados negativos, para as duas espécies identificadas.

Na mesma tabela pode ainda verificar-se que estirpes identificadas como sendo da mesma espécie, apresentam perfis bioquímicos diferentes, nomeadamente para os isolados AS017 A_{3a} (MDC2447) e AS036 A_{2a1B} (MDC2485), ambos identificados como *Aeromonas hydrophila*. Os isolados bacterianos referidos anteriormente, foram obtidos a partir de amostras de coruja e esquilo, respectivamente, e diferem nas provas da arginina, gluconato e citrato.

4.3.3 Identificação genética

Os métodos convencionais de identificação de isolados bacterianos baseiam-se em propriedades bioquímicas das estirpes, no entanto, hoje reconhece-se que estas características são muito variáveis, tendo uma interpretação muito subjectiva.

Para identificar os isolados utilizados neste trabalho realizou-se a identificação por sequenciação do gene 16S rDNA dos isolados resistentes aos carbapenemos, e sequenciação do gene *gyrB* dos isolados presuntivos do género *Aeromonas*.

As sequências obtidas pela sequenciação do gene 16S rDNA, de acordo com a metodologia mencionada no ponto 3.8.2.4, foram comparadas com as sequências existentes na base de dados do *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Os resultados da identificação por sequenciação do gene 16S rDNA encontram-se referidos na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Identificação das espécies sequenciadas por 16S rDNA, referência UTAD e referência MDC

<i>Referência UTAD</i>	<i>Referência MDC</i>	<i>Identificação do isolado</i>
AS006 C ₂	MDC1276	<i>Shewanella putrefaciens</i>
AS008 A ₁	MDC1277	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
AS027 A ₂	MDC1280	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
AS027 A _{3a}	MDC1281	<i>Acinetobacter</i> sp.

A identificação dos isolados por sequenciação do gene 16S rDNA, permitiu a identificação dos isolados AS006 C₂ (MDC1276) *Shewanella putrefaciens*, isolado de uma amostras de veado, e dos isolados AS027A₂ (MDC1280) *Klebsiella pneumoniae* e AS027A_{3a} (MDC1281) *Acinetobacter* sp., isolados de uma amostra de uma ema, identificação que não tinha sido conseguida pelos métodos de identificação bioquímica da microbiologia convencional, referidos anteriormente. Relativamente ao isolado AS008A₁ (MDC1277) *Pseudomonas fluorescens*, isolado de uma raposa, a identificação por sequenciação coincidiu com a identificação obtida pelo sistema de biotipificação numérico API20NE.

A sequenciação do isolado AS027 A_{3a} (MDC1281) e o estudo da relação filogenética (Figura 4.2) com as estirpes que apresentam maior grau de homologia com o referido isolado, permitiu verificar que se trata de uma espécie do género *Acinetobacter* não descrita.

Relativamente aos isolados com características morfo-fisiológicas do género *Aeromonas* amplificou-se e determinou-se a sequência do gene *gyrB* em 16 isolados. O estudo da sequência do gene 16S rDNA é um dos métodos de identificação mais discriminativos e precisos para determinar o nível de relação filogenética entre bactérias (Martínez-Murcia *et al.*, 1992, Martínez-Murcia, 1999). No entanto, quando se pretende estudar relações próximas, como é o caso de espécies pertencentes ao mesmo género, a

sequenciação deste gene apresenta algumas limitações. Estas advêm do facto do gene 16S rDNA se ter mantido constante durante a sua evolução, sendo uma molécula extremamente conservada. Verifica-se frequentemente que espécies distintas apresentam poucas diferenças nucleotídicas no gene 16S rDNA (Fox *et al.*, 1992, Stackbrandt e Goebel, 1994). Por esta razão, foi necessária a sequenciação do gene *gyrB*. A sequenciação do gene *gyrB* permite estudar as relações filogenéticas e identificar os isolados bacterianos dentro de um marco filogenético, tendo-se mostrado útil como forma de identificação dos microrganismos do género *Aeromonas* (Yáñez *et al.*, 2003).

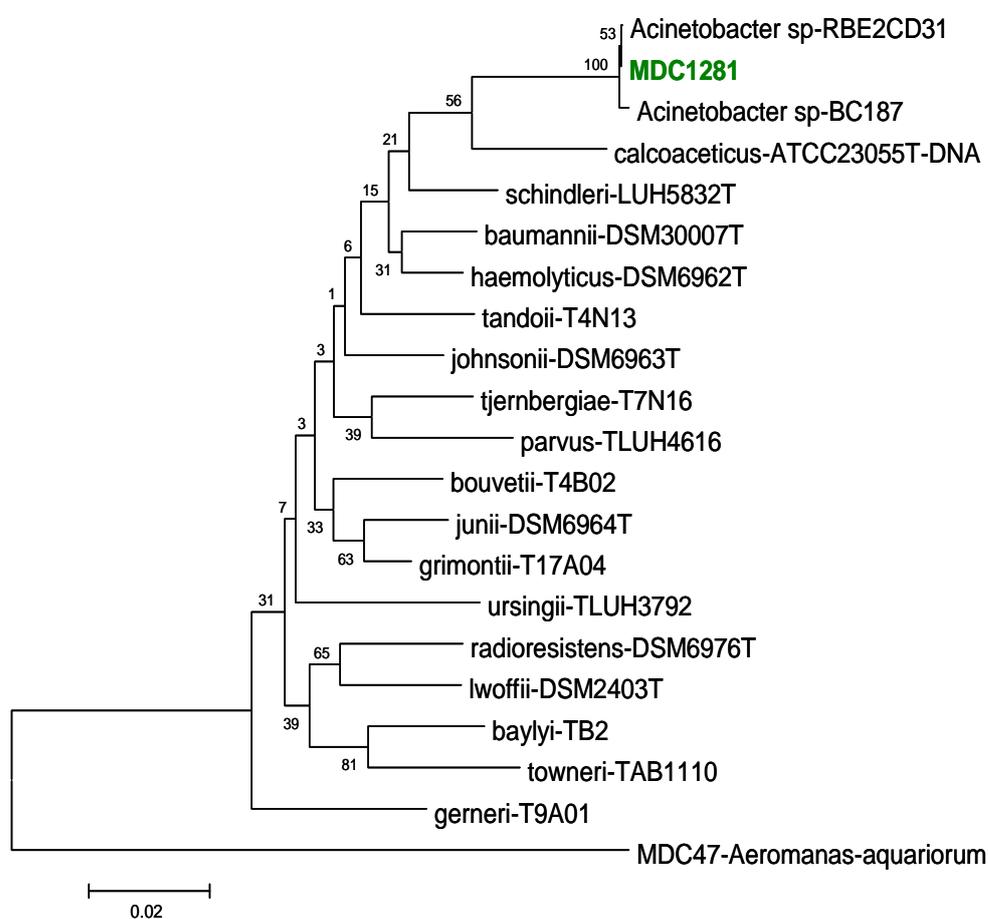


Figura 4.2 - Árvore filogenética obtida com a sequência do gene 16S rDNA da estirpe AS027 A_{3a} (MDC1281) isolada neste estudo, na figura a verde, e as estirpes do género *Acinetobacter* e com isolados com maior grau de homologia com a estirpe.

As sequências obtidas da sequenciação do gene *gyrB*, foram comparadas com a base de dados do laboratório MDC, *Molecular Diagnostic Center*, para poder apurar quais as espécies representadas. A árvore filogenética obtida desta análise encontra-se na figura 4.3

Na figura 4.3, observa-se que as sequências obtidas pertencem a quatro espécies do género *Aeromonas*: *Aeromonas salmonicida* (n=9); *Aeromonas eucrenophila* (n=4); *Aeromonas bestiarum* (n=2) e *Aeromonas veronii* (n=1).

A identificação das estirpes em estudo através da sequenciação do gene *gyrB* não coincidiu com a identificação obtida pelos métodos de identificação bioquímica, sistema numérico API 20NE, o que consolida a importância da realização da identificação das estirpes por métodos de sequenciação.

Para as espécies do género *Aeromonas*, a sequenciação parcial do gene que codifica para a subunidade B da DNA girase, topoisomerases do tipo II que controla o grau de superenrolamento da molécula de DNA (Champoux, 2001), permitiu identificar as estirpes isoladas a nível da espécie. Além disso, ainda que normalmente estas sequências representem diversidade entre as estirpes de uma espécie (nível intra-espécie), existem estirpes com idênticas sequências de *gyrB*.

Na tabela 4.5 podem-se observar as estirpes bacterianas que apresentam idênticas sequências de *gyrB*. Verifica-se, pela análise da tabela, que existem dez sequências diferentes de *gyrB*. Destas dez sequências, sete correspondem à espécie *Aeromonas salmonicida*, uma à espécie *Aeromonas bestiarum*, uma à espécie *Aeromonas veronii* e uma à espécie *Aeromonas eucrenophila*.

Tabela 4.5 - Estirpes bacterianas com idênticas sequências de *gyrB*

<i>Referência MDC</i>	<i>Idêntica gyrB</i>	<i>Espécie</i>
MDC180	MDC193	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MDC182	-----	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MDC190	-----	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MDC2447	-----	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MDC2485	MDC2486	<i>Aeromonas bestiarum</i>
MDC2487	MDC2488, MDC2489, MDC2490	<i>Aeromonas eucrenophila</i>
MDC2491	-----	<i>Aeromonas veronii</i>
MDC2492	-----	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MDC2493	MDC2494	<i>Aeromonas salmonicida</i>
MDC2495	-----	<i>Aeromonas salmonicida</i>

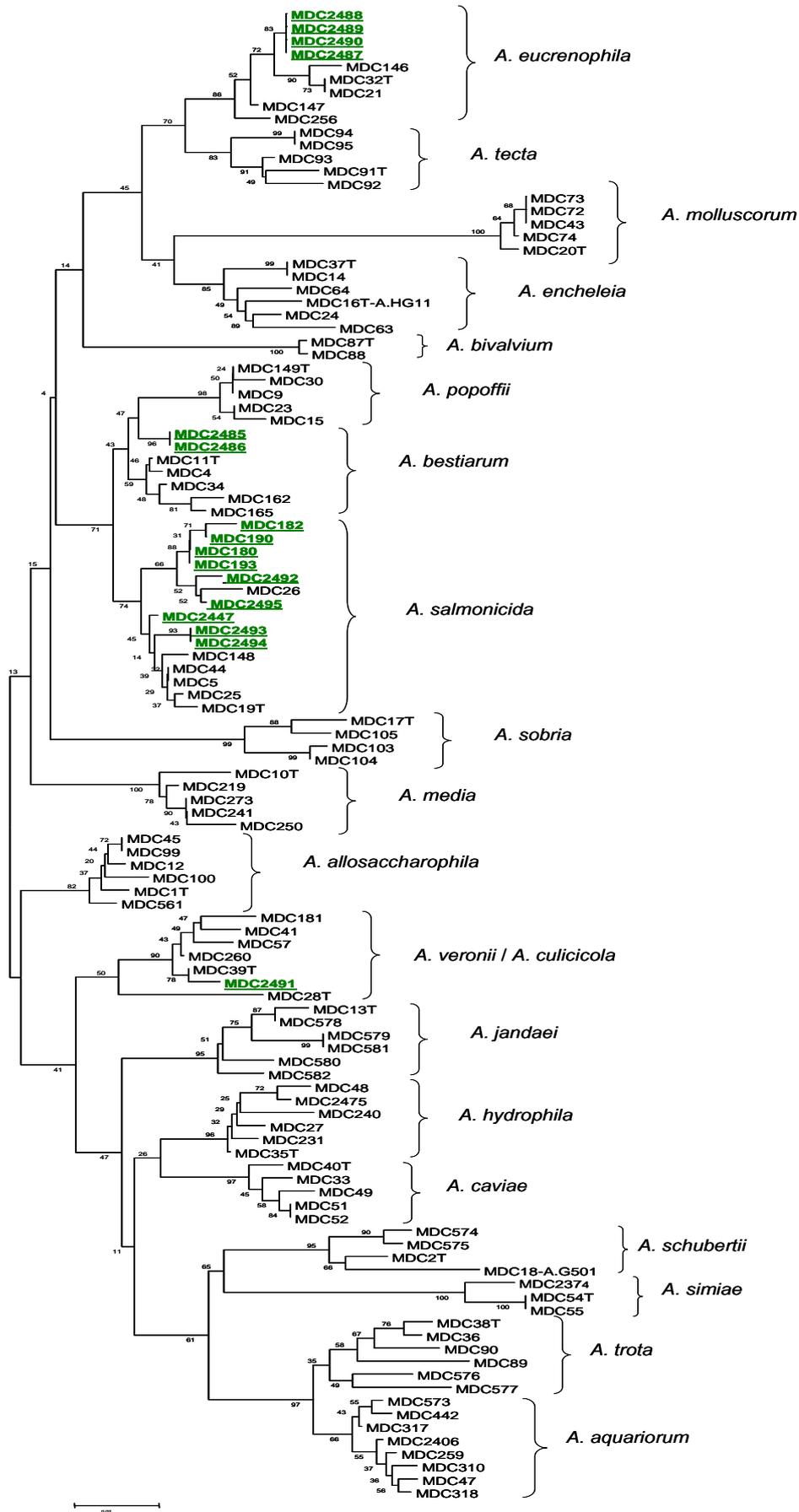


Figura 4.3 - Árvore filogenética obtida com a sequência do gene *gyrB* das estirpes isoladas neste estudo, na figura a verde e as estirpes da coleção do MDC representativas de todas as espécies do gênero *Aeromonas*.

4.4 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

4.4.1 Método de difusão em disco

Sendo um dos objectivos do trabalho avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antibióticos β -lactâmicos, foram realizados testes de susceptibilidade a quinze agentes antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos, pelo método de difusão em disco.

Foram seleccionadas 4 estirpes para serem estudadas devido ao facto de apresentarem resistência ao imipenemo e 16 por pertencerem ao género *Aeromonas*.

Na tabela 4.6 estão representados os perfis de susceptibilidade dos isolados que apresentaram resistência ao imipenemo. Pela análise da tabela verifica-se que a actividade antimicrobiana mais eficaz foi apresentada pelos agentes antimicrobianos piperacilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima e cefepima, antibióticos que inibem o crescimento de todas as estirpes. Por outro lado, na determinação da susceptibilidade dos isolados, a actividade antimicrobiana menos eficaz foi apresentada pela amoxicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico e pela cefalotina, cefalosporina de primeira geração.

Nos isolados AS027A₂ (MDC1280) e AS027A_{3a} (MDC1281), isolados a partir de uma amostra de coruja, a associação da ticarcilina com o inibidor de β -lactamases, ácido clavulânico, provocou a diminuição dos halos de inibição de 19 mm para 12 mm e de 17 mm para 10 mm, respectivamente, ao contrário do que era esperado.

O isolado AS006C₂ (MDC1276), obtido de uma amostra de veado, foi o único a apresentar susceptibilidade à actividade dos agentes antimicrobianos ticarcilina, ticarcilina/ ácido clavulânico, aztreonamo e à cefoxitina. Por outro lado a estirpe bacteriana isolada de uma amostra de raposa, AS008A₁ (MDC1277), foi a única a apresentar resistência à cefalosporina de terceira geração cefotaxima.

Para além dos β -lactâmicos foi determinado o perfil de susceptibilidade a outros agentes antimicrobianos das classes: quinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina, fosfomicina e co-trimoxazol.

Relativamente aos aminoglicosídeos testados (amicacina, tobramicina, canamicina, gentamicina e estreptomina) a estreptomina foi o agente antimicrobiano que

apresentou melhor actividade antimicrobiana. Os isolados foram resistentes à actividade do agente antimicrobiano fosfomicina. De referir que apenas o isolado AS006C₂ (MDC1276) foi sensível à actividade dos antimicrobianos cloranfenicol, co-trimoxazol e tetraciclina.

Tabela 4.6 - Perfis de susceptibilidade dos isolados resistentes ao imipenemo

	Amoxicilina	Amoxicilina/ ácido clavulânico	Ticarcilina	Ticarcilina/ Ácido clavulânico	Piperacilina	Piperacilina/ tazobactam	Aztreonamo	Imipenemo	Cefalotina	Cefoxitina	Ceftazidima	Cefotaxima	Ceftriaxona	Cefoperazona	Cefepima
AS006 C ₂ MDC1276	12 R	13 R	20 S	20 S	22 S	26 S	S	R	8 R	28 S	S	S	S	22 S	S
AS008 A ₁ MDC1277	R	R	12 R	R	30 S	30 S	13 R	R	R	R	26 S	14 R	14 I	21 S	27 S
AS027 A ₂ MDC1280	R	R	19 I	12 R	23 S	23 S	14 R	13 R	R	10 R	19 S	17 I	15 I	10 R	21 S
AS027 A _{3a} MDC1281	9 R	8 R	17 I	10 R	20 I	22 S	15 R	12 R	R	9 R	21 S	19 I	15 I	10 R	22 S

Legenda: R - resistente; I - intermédio; S - sensível.

Na figura 4.4 estão representados os perfis de susceptibilidade, dos isolados pertencentes ao género *Aeromonas*, aos antibióticos β -lactâmicos. Pela análise da figura verifica-se que a associação de inibidores de β -lactamases possibilitou a recuperação da actividade das penicilinas amoxicilina, ticarcilina e piperacilina, como ficou demonstrado pelo aumento dos halos de inibição obtidos com a associação amoxicilina/ácido clavulânico, ticarcilina/ácido clavulânico e piperacilina/ tazobactam, sendo que a melhor sinergia consistiu na associação da amoxicilina com o ácido clavulânico, ao permitir a diminuição da taxa de resistência de 93% para 27%.

Dentro do grupo das cefalosporinas verifica-se que a actividade antimicrobiana mais eficaz foi apresentada pela ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, cefoperazona (cefalosporinas de terceira geração) e cefepima (cefalosporinas de quarta geração), inibindo o crescimento de todas as estirpes. Por outro lado a cefalotina, cefalosporina de primeira geração, foi o agente antimicrobiano ao qual as estirpes apresentaram maior resistência.

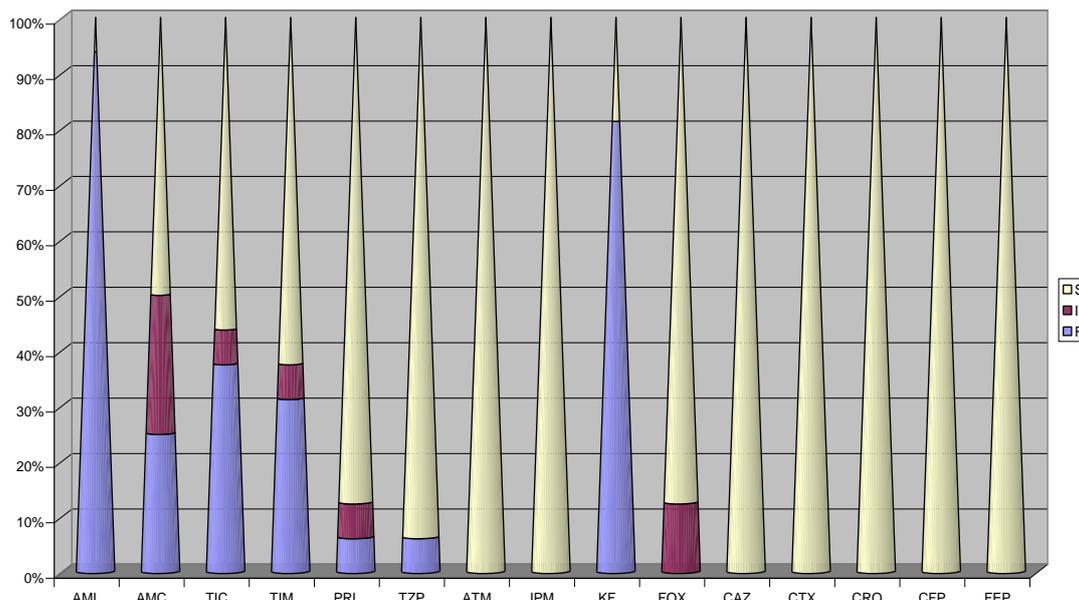


Figura 4.4 - Perfil de susceptibilidade dos isolados pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Legenda: AML - Amoxicilina, AMC - amoxicilina/ácido clavulânico, TIC - ticarcilina, TIM - ticarcilina/ácido clavulânico, PRL - piperacilina, TZP - piperacilina/tazobactam, ATM - aztreonamo, IPM - imipenemo, KF - cefalotina, FOX - cefoxitina, CAZ - ceftazidima, CTX - cefotaxima, CRO - ceftriaxona, CFP - cefoperazona e FEP - cefepima

No que diz respeito ao imipenemo (carbapenemo) e ao aztreonamo (monobactâmico) estes agentes antimicrobianos apresentaram uma taxa de sensibilidade de 100%.

Para as restantes classes de antibióticos testadas verifica-se que os agentes antimicrobianos mais eficazes foram a fosfomicina, ciprofloxacina, cloranfenicol e co-trimoxazol.

Por outro lado, na determinação da susceptibilidade dos isolados do gênero *Aeromonas*, a actividade antimicrobiana menos eficaz foi apresentada pela eritromicina (macrólido), em que 93% dos isolados bacterianos demonstraram resistência, seguida da estreptomicina (aminoglicosídeo) e da tetraciclina (30%).

De salientar que tanto os isolados resistentes ao imipenemo como os isolados do gênero *Aeromonas* apresentavam fenótipo multirresistente.

4.4.2 Método de difusão em agar com tiras (E-test)

Nos isolados bacterianos AS008 A₁ (MDC1277), isolado de uma raposa, AS027 A₂ (MDC1280) e AS027 A_{3a} (MDC1281), isolados de uma ema, foi pesquisada a presença

de β -lactamases de espectro alargado (ESBLs), pelo método de difusão em agar Mueller-Hinton com tiras E-test, (PM/PML) (Figura 4.5). Foram seleccionados estes três isolados bacterianos, por apresentarem resistência aos agentes antimicrobianos aztreonamo, cefalotina, cefotaxima e ceftazidima, resistências que frequentemente são devidas a produção de β -lactamases de espectro alargado (Bradford, 2001; Grupa, 2007; Li *et al.*, 2007).

Para além da resistência aos β -lactâmicos as estirpes apresentam resistência aos antimicrobianos cloranfenicol, co-trimoxazol e tetraciclina. Muitas das bactérias produtoras de β -lactamases de espectro alargado são estirpes multirresistentes devido ao facto da maioria destas enzimas serem codificadas por genes localizados em plasmídeos, que frequentemente transportam genes de resistência a outros agentes antimicrobianos, como o cloranfenicol, co-trimoxazol, tetraciclina e ciprofloxacina (Poirel *et al.*, 2000; Grupa, 2007).



Figura 4.5-Pesquisa de ESBLs pelo método de difusão em agar com tiras, estirpe AS027A_{3a} (MDC1281) [Fonte: Este trabalho].

Os isolados AS027A₂ (MDC1280) e AS027A_{3a} (MDC1281), foram considerados produtores de ESBLs, uma vez que ocorreu diminuição da concentração mínima inibitória com a associação cefepima/ ácido clavulânico, a razão dos dois breakpoints foi superior a 8 mm. De acordo com as normas do CLSI, breakpoints superiores a 8 mm evidenciam a presença de ESBLs.

4.4.3 TESTE DE SINERGISMO DO DUPLO DISCO

A pesquisa de β -lactamases de espectro alargado foi realizada também pelo método do sinergismo do duplo disco com a ceftazidima, cefotaxima, aztreonamo e amoxicilina/ ácido clavulânico.

Com este método verificou-se que havia um pequeno sinergismo da amoxicilina/ácido clavulânico com o aztreonamo, mas apenas na estirpe AS027A₂ (MDC 1280) (Figura 4.6).

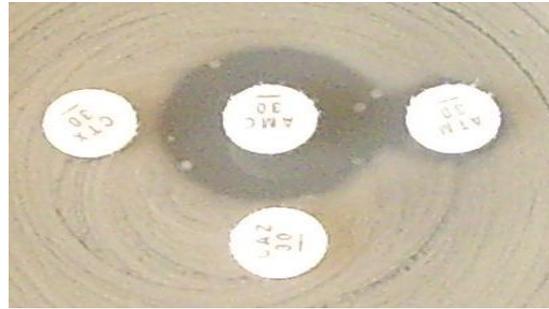


Figura 4.6 – Pesquisa de ESBLs pelo método de sinergismo do duplo disco na estirpe AS027A₂ (MDC1280) [Fonte: Este trabalho].

4.5 CARACTERIZAÇÃO DE β -LACTAMASES

4.5.1 Teste do nitrocefim

Após a obtenção dos extractos enzimáticos das estirpes resistentes ao imipenemo e dos isolados do género *Aeromonas* verificou-se que com a excepção dos isolados AS006 C₂ (MDC1276) (posição 1), AS006 C_{3C1} (MDC181) (posição 3) e AS036 A_{2a1B} (MDC2485) (posição 7), todos os extractos enzimáticos mostraram actividade β -lactamásica, após a adição da cefalosporina cromogénica, nitrocefim.

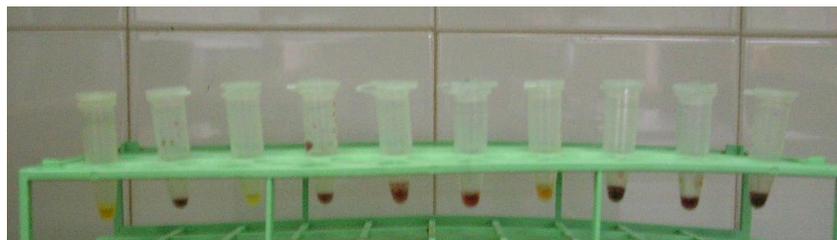


Figura 4.7 - Resultados do teste do nitrocefim das estirpes AS006 C₂ (MDC 1276), AS006C_{3b1} (MDC 180), AS006 C_{3C1} (MDC 182), AS008 A₁ (MDC 1277), AS027 A₂ (MDC 1280), AS027 A_{3a} (MDC 1281), AS036 A_{2a1B} (MDC 2485), AS036 B_{1a2} (MDC 2486), AS044 A_{2a1} (A) (MDC 2487) e AS115 A_{2GSP1} (MDC 2492). [Fonte: Este trabalho].

A resistência aos carbapenemos nos isolados que não apresentaram actividade β -lactamásica, com a adição do nitrocefim, poderá ser devida à presença de metalo- β -lactamases, uma vez que esta cefalosporina só detecta as carbapenemases de centro serina (Matthew *et al.*, 1975; Queenan e Bush, 2007).

4.5.2 Determinação do ponto isoeléctrico das β -lactamases

Através da focagem isoeléctrica num gel de poliacrilamida com anfóliticos de gradiente de pH de 3 a 9, verificou-se que apenas o isolado AS117 GSP₂ A (MDC 2493), isolado obtido de uma amostra de veado, apresentou uma banda na zona alcalina do gel, próximo do ponto de pH8.2.

4.5.3 Detecção de carbapenemases por um ensaio microbiológico

Procedeu-se à pesquisa, por um ensaio microbiológico, de metalo- β -lactamases com actividade hidrolítica sobre os carbapenemos, nos isolados bacterianos do género *Aeromonas* e nos isolados que apresentavam fenótipo de resistência ao imipenemo. A formação de um halo de inibição de crescimento da cultura bacteriana de *E. coli* ATCC25922 (Figura 4.8), junto aos discos correspondentes aos extractos dos isolados bacterianos, evidenciou a ausência da produção de metalo- β -lactamases por parte dos isolados do género *Aeromonas* e dos isolados resistentes ao imipenemo.

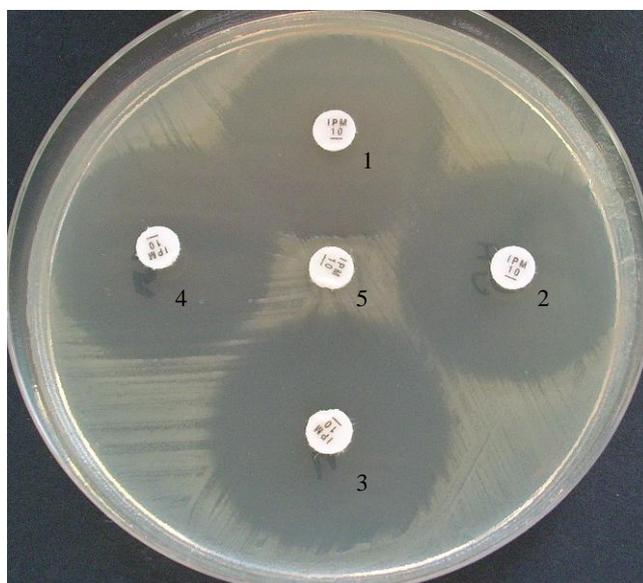


Figura 4.8 – Ensaio microbiológico para a pesquisa de carbapenemases

Legenda: 1-disco comercial de imipenemo (10 μ l) (controlo negativo), 2-extracto da estirpe AS006C₂ (MDC1276), 3-extracto da estirpe AS008A₂ (MDC1277), 4-extracto da estirpe AS070GSP₁ (MDC24910); 5- extracto da estirpe *Serratia fonticola* UTAD054 (controlo positivo).

[Fonte: Este trabalho].

4.5.4 Detecção genotípica de carbapenemases

Os carbapenemos apresentam um amplo espectro de actividade, constituindo uma importante opção terapêutica em infecções provocadas por bacilos Gram negativos multirresistentes (Kim *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2008).

A produção de carbapenemases é um dos mecanismos de resistência que possibilita a hidrólise de todas as classes de β -lactâmicos, incluindo os carbapenemos (Livermore e Woodford, 2006; Sevillano *et al.*, 2008).

Nos últimos anos verificou-se um aumento do número de publicações sobre a detecção de carbapenemases em bacilos Gram negativos, sobretudo em ambiente clínicos, nomeadamente em isolados de *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Tolman *et al.*, 2007). Este aumento tem-se observado também em isolados bacterianos de origem animal (Li *et al.*, 2007).

Neste trabalho foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{CphA}, *bla*_{IMP-type}, *bla*_{VIM-type}, e *bla*_{OXA-type} (*bla*_{OXA-aer}, *bla*_{OXA-b}, *bla*_{OXA-c}) que codificam para as carbapenemases CphA, IMP-type, VIM-type, com iões metálicos no centro activo, e OXA-type, carbapenemases de centro serina, respectivamente, em estirpes bacterianas isoladas de animais selvagens de distintos nichos ecológicos, que apresentam fenótipo de resistência aos carbapenemos e em 16 isolados do género *Aeromonas*. Apesar de algumas estirpes do género *Aeromonas* apresentarem susceptibilidade *in vitro* aos carbapenemos, estas estirpes podem possuir genes de resistência que codificam para carbapenemases (Walsh *et al.*, 2002; Libisch *et al.*, 2008).

Para além dos genes que codificam as carbapenemases CphA, IMP-type, VIM-type e OXA-type, foram também pesquisados os genes *bla*_{TEM-type}, *bla*_{SHV-type}, *bla*_{CTX-M-type}, *bla*_{MOX} e *bla*_{FOX}, genes que codificam as β -lactamases de espectro alargado TEM, SHV, CTX-M, de classe A e as β -lactamases de espectro alargado de classe C MOX e FOX, respectivamente, uma vez que as carbapenemases são habitualmente produzidas em associação com outras β -lactamases (Sousa, 2006). Na tabela 4.7 encontram-se os resultados obtidos na pesquisa das β -lactamases.

Recorrendo à técnica de PCR com primers específicos, verificou-se que dos 20 isolados pesquisados de 16 (80%) foi possível amplificar pelo menos um dos genes de resistência pesquisados. Destes 16 isolados, de 2 dos isolados foi amplificado um gene

de resistência, de 12 foram amplificados 2 genes de resistência, de 1 foram amplificados três genes de resistência e de 1 foram amplificados 5 dos 11 genes de resistência pesquisados.

Os genes de resistência detectados com maior frequência foram: o gene *bla*_{OXA-aer}, presente nos isolados de *Aeromonas eucrenophila* (n=4), *Aeromonas salmonicida* (n=4), *Aeromonas bestiarum* (n=2), *Aeromonas veronii* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1) e *Klebsiella pneumoniae* (n=1), o gene *bla*_{FOX} (n=9) presente nos isolados de *Aeromonas salmonicida* (n=4), *Aeromonas eucrenophila* (n=4) e *Aeromonas veronii* (n=1), e o gene *bla*_{CphA} (n=7) amplificado nos isolados de *Aeromonas salmonicida* (n=4), *Aeromonas bestiarum* (n=2) e *Aeromonas veronii* (n=1).

O gene *bla*_{MOX} foi detectado em duas estirpes do género *Aeromonas*, *Aeromonas salmonicida* (n=1) e *Aeromonas veronii* (n=1).

O gene *bla*_{CTX-M-type}, que codifica a enzima CTX-M, β -lactamase de espectro alargado de classe A, foi detectado na estirpe *Aeromonas veronii*, estirpe da qual foram amplificados cinco genes de resistência aos β -lactâmicos pesquisados, contudo *in vitro* foi sensível a actividade do imipenemo e às cefalosporinas de terceira e quarta geração.

A presença de mais do que uma β -lactamases na mesma estirpe aumenta o nível de resistência das estirpes aos antibióticos β -lactâmicos, e isso pode potencialmente resultar num maior risco para o fracasso da terapêutica com estes agentes antimicrobianos (Brinas *et al.*, 2003; Teale *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

Não se observou nenhum produto de amplificação utilizando os primers específicos para os genes de resistência *bla*_{IMP-type}, *bla*_{VIM-type}, e *bla*_{OXA-b}, *bla*_{OXA-c}.

A resistência ao imipenemo nas estirpes *Acinetobacter* sp. e *Shewanella putrefaciens*, estirpes bacterianas não possuidoras dos genes de resistência pesquisados, pode ser explicada devido à existência de outros mecanismos de resistência, nomeadamente a deficiente expressão ou ausência de porinas com afinidade para os carbapenemos, produção de outras β -lactamases, como por exemplo SLB-1 ou SFB-1, carbapenemases de classe B descritas em espécies do género *Shewanella*, mecanismo de efluxo e/ou mutações nas PBPs (Poirel *et al.*, 2005; Poirel e Nordmann, 2006; Bratu *et al.*, 2008).

Tabela 4.7 - Genes de resistência aos β -lactamases amplificados nas estirpes resistentes aos carbapenemos e nas estirpes do género *Aeromonas*

Ref. ^a UTAD	Ref. ^a MDC	Espécie	<i>bla</i> _{CphA}	<i>bla</i> _{OXA-aer}	<i>bla</i> _{oxa-B}	<i>bla</i> _{oxa-C}	<i>bla</i> _{MOX}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{FOX}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{VIM}
AS006 C ₂	MDC 1276	<i>S. putrefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS006 C _{3b} ₁	MDC 180	<i>A. salmonicida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS006 C _{3c} ₁	MDC 182	<i>A. salmonicida</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS006 C _{3c} ₂	MDC 190	<i>A. salmonicida</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS006 C _{3d} ₂	MDC 193	<i>A. salmonicida</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS008 A ₁	MDC 1277	<i>P. fluorescens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS017 A _{3a}	MDC 2447	<i>A. salmonicida</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
AS027 A ₂	MDC 1280	<i>K. pneumoniae</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
AS027 A _{3a}	MDC 1281	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS036 A _{2a} _{1b}	MDC 2485	<i>A. bestiarum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS036 B _{1a} ₂	MDC 2486	<i>A. bestiarum</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS044 A _{2a} _{1(A)}	MDC 2487	<i>A. eucrenophila</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS044 A _{2a} _{1(B)}	MDC 2488	<i>A. eucrenophila</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS044 A _{2a} _{1(C)}	MDC 2489	<i>A. eucrenophila</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS044 B _{2b} _{1A}	MDC 2490	<i>A. eucrenophila</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS070 GSP ₁	MDC 2491	<i>A. veronii</i>	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-
AS115A ₂ GSP ₁	MDC 2492	<i>A. salmonicida</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AS117GSP _{2A}	MDC 2493	<i>A. salmonicida</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS117GSP _{2C} ₁	MDC 2494	<i>A. salmonicida</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AS119GSP _{1C} ₁	MDC 2495	<i>A. salmonicida</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Confrontando a pesquisa fenotípica de metalo- β -lactamases com a pesquisa genotípica verificou-se a presença de falsos negativos na pesquisa por métodos fenotípicos, ou seja, na pesquisa com o ensaio microbiológico obtiveram-se resultados negativos na detecção de metalo- β -lactamases, mas por PCR observou-se a amplificação do gene de resistência *bla*_{CphA} em sete dos isolados bacterianos do género *Aeromonas*, gene que codifica a metalo- β -lactamase CphA, carbapenemase de centro metálico de classe Bb.

Relativamente à pesquisa fenotípica realizada para a detecção de β -lactamases de espectro alargado, pelo método de difusão com tiras E-test e pelo método de sinergismo do duplo disco, obtiveram-se resultados positivos na estirpe AS027 A₂ (MDC1280), estirpe bacteriana isolada de uma amostra de ema, identificada como *Klebsiella pneumoniae*, resultados confirmados por PCR, tendo sido amplificados os genes *bla*_{TEM-type} e *bla*_{SHV-type}, genes de resistência que codificam as ESBLs TEM e SHV, respectivamente, enzimas que conferem resistências às penicilinas e às cefalosporinas de terceira geração.

No isolado AS027 A_{3a} (MDC1281) obtiveram-se resultados positivos com o método de difusão em disco com tiras E-test, mas com o teste fenotípico de sinergismo do duplo disco obtiveram-se resultados negativos. Através da técnica de PCR, com os primers utilizados para as ESBLs, não foram detectados genes de resistência no referido isolado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em conta a crescente importância do aparecimento de estirpes bacterianas multirresistentes, isoladas de diferentes nichos ecológicos, torna-se necessário monitorizar o seu padrão de distribuição, de modo a poder perspectivar a possibilidade de bactérias isoladas de animais selvagens serem fonte de reservatórios de genes de resistência.

Para que a referida monitorização dos padrões de distribuição de genes de resistência aos antimicrobianos seja eficaz torna-se pertinente a utilização de métodos de identificação adequados à origem dos isolados, expeditos e fiáveis que se baseiem não apenas em características fenotípicas mas também em características genotípicas. Os métodos genéticos de identificação como a sequenciação do gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal e/ou outros genes housekeeping são os métodos mais exactos na identificação das estirpes bacterianas.

Pela sequenciação do gene 16S rDNA, do isolado AS027 A_{3a} (MDC1281), isolado bacteriano obtido a partir de uma amostra de uma ema, e com o estudo da relação filogenética com as estirpes que apresentam maior grau de homologia com o referido isolado, verificou-se, que se trata de uma espécie do género *Acinetobacter* não descrita.

A identificação por sequenciação do gene *gyrB* é uma ferramenta útil para estudos de diversidade filogenética, revelando-se uma técnica útil para a identificação das espécies pertencentes ao género *Aeromonas*, tendo sido identificadas quatro espécies do género *Aeromonas*, *A. salmonicida*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* e *A. bestiarum*.

Da análise dos perfis de susceptibilidade dos 27 antibióticos testados neste trabalho, foram obtidos isolados bacterianos com resistência ao imipenemo, antibiótico β -lactâmico de uso hospitalar, pelo que o problema da resistência antimicrobiana deve ser abordado numa perspectiva global, dado que os vários ecossistemas estão

interligados, nomeadamente hospitais, comunidade em geral e explorações de animais existindo uma ampla oportunidade de os microrganismo resistentes serem transferidos.

Detectou-se multirresistência aos antibióticos testados, em todos os isolados, facto pelo qual se recomenda o uso racional de antimicrobianos, tornando-se necessário evitar o seu uso desnecessário.

Confrontando os resultados dos testes de pesquisa fenotípica de β -lactamases com os testes de pesquisa genotípica, verifica-se que nem sempre os resultados dos testes fenotípicos coincidem com os resultados da pesquisa genotípica.

Relativamente aos isolados resistentes aos carbapenemos foram amplificadas as carbapenemases de classe D (oxacilinas) em dois dos isolados, um destes isolados amplificou ainda as enzimas TEM e SHV, β -lactamases de espectro alargado de classe A.

Oitenta por cento das estirpes amplificaram pelo menos um dos genes de resistência pesquisados. Em algumas estirpes foram detectados mais do que um gene de resistência, havendo uma estirpe do género *Aeromonas* da qual foram amplificados cinco genes de resistência aos β -lactâmicos.

Na amostra de veados AS006 foram obtidos quatro isolados, três do género *Aeromonas* e um do género *Shewanella*. Dois destes isolados do género *Aeromonas* amplificaram o gene de resistência bla_{CphA} , gene que codifica para a metalo- β -lactamase de classe A CphA.

Os genes mais amplificados foram os genes bla_{CphA} , $bla_{OXA-aer}$ e bla_{FOX} . Não foram detectados os genes $bla_{IMP-type}$, $bla_{VIM-type}$, $bla_{OXA-B-type}$ e $bla_{OXA-C-type}$;

Nos isolados AS006C2 (MDC 1276), AS006 C₃b₁ (MDC 180), AS006 C₃c₁ (MDC 182), AS027A₃a (MDC 1281) não foram amplificados nenhuns dos genes de resistência pesquisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, E. P., Chain, E., 1940. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, **146**: 837;

Afzal-Shah, M., Livermore, D. M., 1998. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp.. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **41**: 576 - 577;

Afzal-Shah, M., Villar, H. E., Livermore, D. M., 1999. Biochemical characteristics of a carbapenemase from *Acinetobacter baumannii* isolate collected in Buenos Aires, Argent. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **41**: 576 - 577;

Alekshun, M. N, Levy, S. B., 2007. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Leading Edge Review*, **23**: 1037 - 1050;

Ambler, R. P., 1980. The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **289**: 321 - 331;

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 1612 - 1615;

Arstila, T., Jacoby, G. A., Houvinen, P., 1993. Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of β -lactamases by isoelectric focusing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **32**: 809 - 816;

Aubron, C., Poirel, L., Ash Ronald, J., Nordmann, P., 2005. Carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 260 - 264;

Babic, M., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. *Drug Resistance Updates*, **9**: 142 - 156;

Bandoh, K., Ueno, K., Watanabe, K., Kato, N., 1993. Susceptibility patterns and resistance to imipenem in the *Bacteroides fragilis* group species in Japan: a 4-year study. *Clinical Infectious Disease*, **16**: 382 - 386;

Bandoh, K., Watanabe, K., Muto, Y., Tanaka, Y., Kato, N., Ueno, K., 1992. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Antibiotics* (Tokyo), **45**: 542 - 547;

Bassetti M., Righi, E., Viscoli, C., 2008. Novel β -lactam antibiotics and inhibitor combinations. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **17**: 285 - 296;

Bebrone, C., 2007. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, **74**: 1686 - 1701;

Bellais, S., Poirel, L., Leotard, S., Naas, T., Nordmann, P., 2000. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 3028 - 3034;

Bonnet, R., Marchandin, H., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Jumas – Bilak, E., Sirot, J., 2002. Chromosome-encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 2004 - 2006;

Boschi, L., Mercuri, P. S., Riccio, M. L., Amicosante, G., Galleni, M., Frère, J. M., Rossolini, G. M., 2000. The *Legionella (Fluoribacter) gormanii* metallo- β -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3 β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 1538 - 1543;

Bradford, P. A. 2001. What's New in β -lactamases? *Current Infectious Disease Reports*, **3**: 13 - 19;

Brinas, L., Moreno, M.A., Zarazaga, M., Porrero, C., Saenz, Y., Garcia, M., Dominguez, L., Torres, C., 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14, and SHV-12 β -lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 2056 - 2058;

Brown, S., Bantar, C., Young, H. K., Amyes, S. G. B., 1996. An outbreak of imipenem resistance in *Acinetobacter* strains from Buenos Aires, Argentina. In *Abstracts of the 36th Interscience conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, New Orleans, 1996. Abstract C122, p. 56. American Society for Microbiology, Washington, DC;

Bush, K., 1989. Excitement in the β -lactamases arena. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **24**: 831 - 836;

Bush, K., 1998. Metallo- β -lactamases: a class apart. *Clinical Infectious Diseases*, **27**: 48 - 53;

Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiro, A. A., 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 1211 - 1233;

Castanheira, M., 2005. Caracterização de genes que codificam β -lactamases mediadas por integrons de classe 1 em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. *Universidade Federal de São Paulo*, pp.4 - 20;

Castanheira, M., Mendes, R. E., Murphy, T. A., Toleman, M. A., Sader, H. S., Jones, R. N., Walsh, T. R., 2003. Characterization of Mobile Elements Carrying Metallo- β -Lactamase (M β L) Genes, *blaIMP-1*, *blaIMP-16*, *blaSPM-1*, *blaVIM-2* from Latin American Medical Centers: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. In *43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstracts* C2-2023, p. 153;

Castanheira, M., Mendes, R. E., Walsh, T. R., Gales, A. C., Jones, R. N., 2004. Emergence of the extended-spectrum β -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 2344 - 2345;

Champoux, J. J., 2001. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual Review of Genetics*, **70**: 369 - 413;

Chee-Sanford, J. C., Aminov, R. I., Krapac, I. J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R. I., 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1494 - 1502;

Chen, Y. H., Succi, J., Tenover, F. C., Koehler, T. M., 2003. β -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Journal of Bacteriology*, **185**: 823 - 830;

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA;

Costa S. F., Woodcock, J., Child, J., Caiaffa, H. H., Gill, M., Wise, R., 1996. Characterization of the β -lactamase and outer-membrane proteins of imipenem-resistance *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Brazil. In *Abstracts of the 36th Interscience conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, New Orleans, 1996. Abstract C123, p.56. American Society for Microbiology, Washington, DC;

Crowder, M. W., Spencer, J., Vila, A. J., 2006. Metallo- β -lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria. *Accounts of Chemical Research*, **39**: 721 - 728;

Cuchural, G. J. Jr., Malamy, M. H., Tally, F. P., 1986. β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **30**: 645 - 648;

- Da Silva, G. J., Leitao, R., Peixe, L., 1999.** Emergence of carbapenemhydrolyzing enzymes in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 2109 - 2110;
- Dalla-Costa, L. M., Coelho, J. M., Souza, H. A. P., Castro, M. E. S., Stier, C. J. N., Bragagnolo, K. L., Rea-Neto, A., Penteado-Filho, S. R., Livermore, D. M., Woodford, N., 2003.** Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 3403 - 3406;
- Davies, T. A., Shang, W., Bush, K., Flamm, R. K., 2008.** Affinity of Doripenem and Comparators to Penicillin-Binding Proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **52**: 1510 - 1512;
- Donald, H. M., Scaife, W., Amyes, S. G., Young, H. K., 2000.** Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenemo resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **44**: 196 - 199;
- Dropa, M., 2006.** Caracterização genotípica de cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital de rede pública da cidade de São Paul. *Universidade de São Paul, Faculdade de Saúde Pública*, pp.55;
- Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M. C., Ayala, J. A., Perea, E. J., 2003.** Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**: 565 - 574;
- Fonseca, M. F., 2005.** Sobreexpressão e purificação da carbapenemase SFC-1 produzida por um isolado de *Serratia fonticola*. *Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia*, pp. 3-7;
- Fonseca, F., Sarmiento, A. C., Henriques, I., Samy, B., Beeumen, J., Domingues, P., Domingues M. R., Saavedra, M. J., Correira, A., 2007.** Biochemical characterization of SFC-1, a classe A carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **51**: 4512 - 4514;
- Fox, G.E., Wisotzkey, J. D., Jurstshuk, P. Jr., 1992.** How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 166 - 170;
- French, G. L., 2005.** Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 1514- 1527;
- Frère, J. M., Galleni, M., Bush, K., Dibeberg, O., 2005.** Is it necessary to change the classification of β -lactam ? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**: 1051 - 1053;

- Gales, A. C., Tognim, M. C., Reis, A. O., Jones, R. N., Sader, H. S., 2003.** Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **45**: 77 - 79;
- Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G. M., Spencer, J., Dideberg, O., Frère, J. M., 2001.** Standard numbering scheme for class B β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 660 - 663,
- George, A., Jacoby, M.D., Munoz-Price, L. S., 2005.** The new β -lactamases. *The new England Journal of Medicine*, **352**: 380 - 391;
- Gerrits, M. M., Schuijffel, D., van Zwet, A. A., Kuipers, E. J., Vandenbroucke- Grauls, C. M., Kusters, J. G., 2002.** Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to β -lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 2229 - 2233;
- Giakkoupi, P., Tzouvelekis, L. S., Tsakris, A., Loukova, V., Sofianou, D., Tzelepi, E., 2000.** IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **44**: 2247 - 2253;
- Giske, C. G., Buarø, L., Sundsfjord, A., Wretling, B., 2008.** Alterations of Porin, Pumps, and Penicillin-Binding Proteins in Carbapenem Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, **14**: 23 - 30;
- González, R. J. M., 2007.** Estudi de les β -lactamases plasmídiques d'espectre ampli't, cefamicinases i carbapenemases en diferents ecosistemes. Anàlisi del seu entorn genètic. *Universitat Autònoma de Barcelona*, pp 22 - 29;
- Gotoh, N., Nunomura, K., Nishino, T., 1990.** Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to cefsulodin: modification of penicillin-binding protein 3 and mapping of its chromosomal gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **25**: 513 - 523;
- Gupta, V., 2007.** An update on newer β -lactamases. *Indian Journal of Medical Research*, **126**: 417 - 427;
- Hanson, N. D., Hossain, A., Buck, L., Moland Ellen, S., Thomson Kenneth, S., 2006.** First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- β -lactamase, IMP-18. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, **50**: 2272- 2273;

Henriques, I., Alexandra, M., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A., 2004. Molecular Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 2321- 2324;

Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A., 2006. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamases genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine water. *Research in Microbiology*, **157**: 938 - 947;

Henriques, I. S., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M. J., Correia, A., 2006. Analyzing diversity among β -lactamases encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**: 418 - 429;

Hirakata, Y., Izumikawa, K., Yamaguchi, T., Takemura, H., Tanaka, H., Yoshida, R., Matsuda, J., Nakano, M., Tomono, K., Maesaki, S., Kaku, M., Yamada, Y., Kamihira, S., Kohno, S., 1998. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 2006 - 2011;

Houvinen, P., Houvine, S., Jacoby, G. A., 1988. Sequence of PSE-2 β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **32**: 134 - 136;

Huang, W. M., 1996. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annual Review of Genetics*, **30**: 79 - 107;

Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N., Ohta, M., 1995. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**: 824- 829;

Kim, S.-Y., Hong, S.G., Moland, E. S., Thomson, K. S., 2007. Convenient Test Using a Combination of Chelating Agents for Detection of Metallo- β -Lactamases in the Clinical Laboratory. *Journal of clinical microbiology* **45**: 2798 - 2801;

Kirby, W. M. M., 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*, **99**: 452 - 453;

Koh, T. H., Wang, G. C., Sing, L. H., 2004. IMP-1 and a novel metallo- β -lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 2334 - 2336;

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., Nei, N., 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, **50**: 602 - 612;

Laraki, N., Franceschini, N., Rossolini, G. M., Santucci, P., Meunier, C., Pauw, E., Amicosante, G., Frère, J. M., Galleni, M., 1999b. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 902 - 906;

Laraki, N., Galleni, M., Thamm, I., Riccio, M. L., Amicosante, G., Frère, J. M., Rossolini, G. M., 1999a?. Structure of In31, a *bla*_{IMP} containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phylogenically related to In5, Which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 890 - 901;

Laurettil, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G. M., 1999. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 1584 - 1590;

Lee, K., Yum, J. H., Yong, D., Lee, H. M., Kim, H. D., Docquier, J.-D., Rossolini, G. M., Chong, Y., 2005. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 4485 - 4491;

Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghiminre, S., Adewaye, L., 2007. β -lactam resistance and β -lactamases in bacterial of animal origin. *Veterinary microbiology*, **121**: 197 - 214;

Li, X., Nikaido, H., 2004. Efflux mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, **64**: 159 - 204;

Libisch, B., Giske, C. G., Kovács, B., Tóth, T. G., Füzi1, M., 2008 Identification of the First VIM Metallo- β -Lactamase-Producing Multiresistant *Aeromonas hydrophila* Strain. *Journal of clinical microbiology*, **46**:1878 - 1880;

Lim, H. M., Pene, J. J., Shaw, R. W., 1988. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 β -lactamase II structural gene. *Journal of Bacteriology*, **170**: 2873 - 2878;

Lim, D., Strynadka, N. C. J., 2002. Structural basic for the β -lactam resistance of PBPs 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural & Molecular Biology*, **9**: 870 - 876;

Livermore, D. M., 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **8**: 557 - 584;

Livermore, D. M., Woodford, N., 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Current Opinion in Microbiology*, **3**: 489 - 495;

- Livermore, D. M., Woodford, N., 2006.** The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*, **14**: 413 - 420;
- Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K. J., Tysall, L., Woodford, N., Livermore, D. M., 2002.** Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**: 4741 - 4743;
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., Dessen, A., 2006.** Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiology Reviews*, **30**: 673 - 691;
- Majiduddin, F. K., Materon, I. C., Palzkill, T. G., 2002.** Molecular analysis of β -lactamase structure and function. *International journal of medical microbiology*, **292**: 127 - 137;
- Mariotte-Boyer, S., Nicolas-Chanoine, M. H. Labia, R., 1996.** A kinetic study of NMC-A β -lactamase, an Ambler class A carbapenemase also hydrolyzing cephamycins. *FEMS Microbiology Letter*, **143**: 29 - 33;
- Massidda, O., Rossolini, G. M., Satta, G., 1991.** The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *Journal of Bacteriology*, **173**: 4611 - 4617;
- Matthew, M., Harris, A. M., Marshall, M. J., Ross, G. W., 1975.** The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *Journal of General Microbiology*, **88**: 169 - 178;
- Martínez-Murcia, A. J., Anton, A. I., Rodríguez-Valera, F., 1999.** Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**: 601 - 610;
- Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S., & Collins M. D., 1992a.** Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Pleisiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: Lack of Congruence with result of DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**: 412 - 421;
- Medeiros, A. A., Hare, R. S., 1986.** β -Lactamase-mediated resistance to penems and carbapenems amongst *Enterobacteriaceae*, abstr. 116. 26th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC;

- Mendes, R. E., Toleman, M. A., Ribeiro, J., Sader, H. S., Jones, R. N., Walsh, T. R., 2004.** Integron Carrying a Novel Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*IMP-16, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 4693- 4702;
- Moland, E. S., Hong, S. G., Thomson, K. S., Larone, D. H., Hanson, N. D., 2007.** Klebsiella pneumoniae isolate producing at least eight different β -lactamases, including Amp and KPC β -lactamses. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**: 800 - 801;
- Naas, T., Bellais, S., Nordmann, P., 2003.** Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing β -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**: 267 - 273;
- Naas, T., Levy, M., Hirschauer, C., Marchandin, H., Nordmann, P., 2005.** Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**: 4826 - 4829;
- Naas, T., Vandael, L., Sougakoff, W., Livermore, D. M., Nordmann, P., 1994.** Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**: 1262 - 1270;
- Neuwirth, C., Siebor, E., Duez, J. M., Pechinot, A., Kazmierczak, A., 1995.** Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **36**: 335 - 342;
- Nicolau, D. P., 2008.** Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opinion Pharmacotherapy*, **9**: 23 - 37;
- Nikaido, H., 2001.** Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **12**: 215 - 223;
- Nikaido, H., 2003.** Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 593 - 656;
- Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., Nicolas, M.-H., 1993.** Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **37**: 939 - 946;
- Nordmann, P., Poirel, L. 2002.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and infectious Diseases*, **8**: 321 - 331;

Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., Kato, N., 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **38**: 71 - 78;

Pagès, J. M., James, C. E. E., Winterhalter, M., 2008. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **6**: 893 - 903;

Paton, R., Miles, R. S., Hood, J., Amyes, S. G. B., 1993. ARI 1: β -lactamase- mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2**: 81 - 87;

Peixe, L. M., 1996. Caracterização de β -lactamases plasmídicas de espectro ampliado em *E. coli*. Tese de Doutorado;

Peleg, A. Y., Franklin, C., Bell, J., Spelman, D. W., 2004. Emergence of IMP-4 metallo- β -lactamase in a clinical isolate from Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **54**: 699- 700;

Pena, A. M. R., 2006. Epidemiologia de metalo- β -lactamases em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes ao imipenemo. *Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia*, pp. 6 - 20;

Perez, A, N., Bonet, I. G., Robledo, E. H., Abascal, R. D., Plou, C. V., 1996. Metallo- β -lactamases in *Acinetobacter calcoaceticus*? *Medical Science Research*, **24**: 315 - 327;

Piddock, L. J. V., 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**: 382 - 402;

Pitout, J. D., Sanders, C. C., Sanders, W. E., Jr. 1997. Antimicrobial resistance with focus on β -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *American Journal of Medicine*, **103**: 51 - 59;

Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V., Nordmann, P., 2004. Emergence of oxacillinase mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 15 - 22;

Poirel, L., Marque, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., Nordmann, P., 2005. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 202 - 208;

Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J.-D., Nordmann, P., 2000. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 891 - 897;

Poirel, L., Nordmann, P., 2006. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **12**: 826 - 836;

Poirel, L., Pitout, J. D., Nordman, P., 2007. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Medicine Ltd*, **2**: 501- 512;

Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M. G., Nordmann, P., 2001. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**: 2598 - 2603;

Poole, K., 2004. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **61**: 2200 - 2223;

Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**: 20 - 51;

Poole, K., 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, **39**:162 - 176;

Pottumarthy, S., Moland, E. S., Jeretschko, S., Swanzy, S. R., Thomson, K. S., Fritsche, T. R., 2003. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerging Infectious Diseases*, **9**: 999 - 1002;

Qi, C., Malczynski, M., Parker, M., Scheetz, M. H., 2008. Characterization of Genetic Diversity of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains Collected from 2004 to 2007. *Journal of clinical microbiology*, **46**: 1106 - 1109;

Quale, J., Bratu, S., Gupta, J., Landman, D., 2006. Interplay of Efflux System, *ampC*, and *oprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 1633 - 1641;

Queenan, A. M., Bush, K., 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, **20**: 440 - 458;

Queenan, A. M., Torres-Viera, C., Gold, H. S., Carmeli, Y., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Quinn, J. P., Hindler, J., Medeiros, A. A., Bush, K., 2000. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 3035- 3039;

Quinteira, S., Ferreira, H., Peixe, L., 2005. First Isolation of *bla*VIM-2 in an Environmental Isolate of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**: 2140 - 2141;

Radice, M., Power, P., Gutkind, G., Fernandez, K., Vay, C., Famiglietti, A., Ricover, N., Ayala, J., 2004. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 1068 - 1069;

Rasmussen, B. A., K. Bush, D. Keeney, Y. Yang, R. Hare, C. O’Gara, and A. A. Medeiros. 1996. Characterization of IMI-1 β -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2080 - 2086;

Rasmussen, B. A., Gluzman Y., Tally, F.P., 1990. Cloning and sequencing of the class B β -lactamase gene (*ccrA*) from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**: 1590 - 1592;

Rasmussen, J. W., Høiby, N., 2007. Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **60**: 470 - 482;

Riccio, M. L., Franceschini, N., Boschi, L., Caravelli, B., Cornaglia, G., Fontana, R., Amicosante, G., Rossolini, G. M., 2000. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 1229 - 1235;

Rossolini, G. M., Condemi, M. A., Pantanella, F., Docquier, J. D., Amicosante, G., Thaller, M. C., 2001. Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 837 - 844;

Rossolini, G. M., Franceschini, N., Lauretti, L., Caravelli, B., Riccio, M. L., Galleni, M., Frère, J.M., Amicosante, G., 1999. Cloning of a *Chryseobacterium* (*Flavobacterium*) *meningosepticum* chromosomal gene (*bla*_{ACME}) encoding an extended-spectrum class A β -lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **43**: 2193 - 2199;

- Saavedra, M. J., Peixe, L., Sousa, J. C., Henriques, I., Alves, A., Correia, A., 2003.** Sfh-1, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**: 2330 - 2333;
- Sabath, L. D., Abraham, E. P., 1966.** Zinco as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. *Biochemical Journal*, **98**: 11- 13;
- Saino, Y., Kobayashi, F., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1982.** Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **22**: 564 - 570;
- Saitu, N., & Nei, M., 1987.** The Neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406 - 425;
- Sanschagrín, F., Dufresne, J., Levesque, R. C., 1998.** Molecular heterogeneity of the L-1 metallo- β -lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 1245 - 1248;
- Scaife, W., Young, H.-K., Paton, R. H., Amyes, S. G. B., 1995.** Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **36**: 585 - 586;
- Schwartz, T., Kohonen, W., Janses, B., Obst, U., 2003.** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**: 325 - 335;
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., 1996a.** PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**: 2909 - 2913;
- Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., 1996b.** Multifocal outbreaks of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β -lactams, including carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**: 349 - 353;
- Sevillano, E., Gallego, L., García-Lobo, J. M., 2008.** First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*, *Pathologie Biologie*;

Shannon, K., King, A., Phillips, I., 1986. β -Lactamases with high activity against imipenem and Sch 34343 from *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **17**: 45 - 50;

Simm, A. M., Higgins, C. S., Pullan, S. T., Avison, M. B., Niumsup, P., Erdozain, O., Bennett, P. M., Walsh, T. R., 2001. A novel metallo- β -lactamase, Mb11b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Letters*, **509**: 350- 354;

Sousa, J. C., 2006. Manual de Antibióticos Antiamericanos. Fundação Fernando Pessoa, Edições Universidade Fernando Pessoa. 2ª Edição, pp. 107 - 315;

Stackebrandt, E., & Goebel, M. B., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**: 846 - 849;

Stern, S., Weiser, B., & Noller, H.F., 1988. Model for the three-dimensional folding of ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology*, **204**: 447 - 481;

Teale, C.J., Barker, L., Foster, A.P., Liebana, E., Batchelor, M., Livermore, D.M., Threlfall, E.J., 2005. Extended-spectrum blactamase detected in *E. coli* recovered from calves in Wales. *Veterinary Record*, **156**:186- 187;

Tellado, J. M., Wilson, S. E., 2005. Empiric treatment of nosocomial intra-abdominal infection: a focus on the carbapenems. *Surg infect (larchmt)*, **6**: 329 - 343;

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**: 4876 - 4882;

Toleman, M. A., Simm, A. M., Murphy, T. A., Gales, A. C., Biedenbach, D. J., Jones, R. N., Walsh, T. R., 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **50**: 673 - 679;

Toleman, M. A., Vinodh. H., Sekar, U., Kamat, V., Walsh, T. R., 2007. blaVIM-2-Harboring Integrons Isolated in India, Russia, and the United States Arise from an Ancestral Class 1 Integron Predating the Formation of the 3' Conserved Sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 2636 - 2638;

- Tsakris, A., Pournaras, S., Woodford, N., Palepou, M. F., Babini, G. S., Douboyas, J., Livermore, D. M., 2000.** Outbreak of infections caused By *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **38**: 1290 - 1292;
- Turton, J. F., Kaufmann, M. E., Glover, J., Coelho, J. M., Warner, M., Pike, R., Pitt, T. L., 2005.** Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**: 3074 - 3082;
- Tysall, L, Stockdale, M. W., Chadwick, P. R., Palepou, M. F., Towner, K. J., Livermore, D. M., Woodford, N., 2002.** IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**: 217 - 218;
- Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Plésiat, P., Pechère, J. C. and Tulkens. P. M., 2003.** Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**: 1055 - 1065;
- Walsh, T. R., A. Bolmstrom, A. Qwarnstrom, and A. Gales. 2002.** Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing. *Journal of clinical microbiology*. **40**: 2755 - 2759;
- Walsh, T. R., Hall, L., Assinder, S. J., Nichols, W. W., Cartwright, S. J., MacGowan, A. P., Bennett, P. M., 1994.** Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1218**: 199 - 201;
- Walsh, T. R., Mark, Toleman, A., Poirel, L., Nordmann, P., 2005.** Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical microbiology reviews*, **18**: 306 - 325;
- Walsh, T. R., Neville, W. A., Haran, M. H., Tolson, D., Payne, D. J., Bateson, J. H., MacGowan, A. P., Bennett, P. M., 1998.** Nucleotide and amino acid sequences of the metallo- β -lactamase, ImiS, from *Aeromonas veronii* bv. *sobria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**: 436 - 439;
- Wang, Z., W. Fast, and S. J. Benkovic. 1999.** On the mechanism of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry*, **38**: 10013 - 10023;
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1991.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **35**: 147- 151;
- Weldhagen, G. F., 2004.** Integrons and β -lactamases - a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **23**: 556- 562;

Wilke, M. S., Lovering, A. L. e Strynadka, N. CJ., 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 525 - 533;

Wright, G. D., 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Publishing Group*, **5**: 175 - 186;

Yamada, M., Watanabe, T., Baba, N., Takeuchi, Y., Ohsawa, F., Gomi, S., 2008. Crystal Structures of Biapenem and Tebipenem Complexed with Penicillin-Binding Proteins 2X and 1A from *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**: 2053 - 2060;

Yáñez, M. A., Catalán, V., Apráiz, D., Figueras, M. J., & Martinez- Murcia, A. J., 2003. Phylogenetic analysis of the members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 875 - 883;

Yang, Y., Wu, P., Livermore, D. M., 1990. Biochemical characterization of a β -lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **34**: 755 - 758;

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F. C., 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **45**: 1151- 1161;

Yu, Y.-S., Du, X.-X., Zhou, Z.-H., Chen, Y.-G., Li, L.-J. , 2006. First isolation of *bla*_{IMI-2} in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 1610 - 1611;

Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Noreddin, A. M. and Karlowsky, J. A., 2007. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*, **67**: 1027 - 1052.

ANEXOS I

MEIO 1 – BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid CM0225)**Composição (g/L)**

Substrato alimentício	27,5
D (+) glucose	2,0
NaCl	5,0
Hidrogenofosfato dissódico	2,5

Nota: Fórmula teórica em g/l de água destilada estéril.

MEIO 2 – Agar G.S.P. (Glutamato Amido Vermelho de Fenol) (Merck 1.10230)**Composição (g/L)**

L (+) glutamato de sódio	10,0
Amido solúvel	20,0
Fosfato ácido de potássio	2,0
Sulfato de magnésio	0,5
Vermelho de fenol	0,36
Agar	12,0

Nota: Fórmula teórica em g/l de água destilada estéril.

MEIO 3 – AUX Medium**Composição (g/L)**

Sulfato de amónio	2,0
Base mineral	82,8
Aminoácidos	0,25
Vitaminas e substâncias nutritivas	0,359
Agar	1,5

Nota: Fórmula teórica em g/l de água destilada estéril. Adicionar 1000 ml de tampão fosfato a 0,04 M a pH 7,1. Acertar o pH final a $7,0 \pm 0,2$.

MEIO 4 – Agar Mueller-Hinton (Oxoid CM0337)**Composição (g/L)**

Extracto de carne	2,0
Bio-case	17,5
Amido	1,5
Agar	17,0

Nota: Fórmula teórica em g/l de água destilada estéril.