UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Diversidade e estudo de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL isoladas de animais selvagens

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Filipe Antunes da Silva Arêde Cristóvão

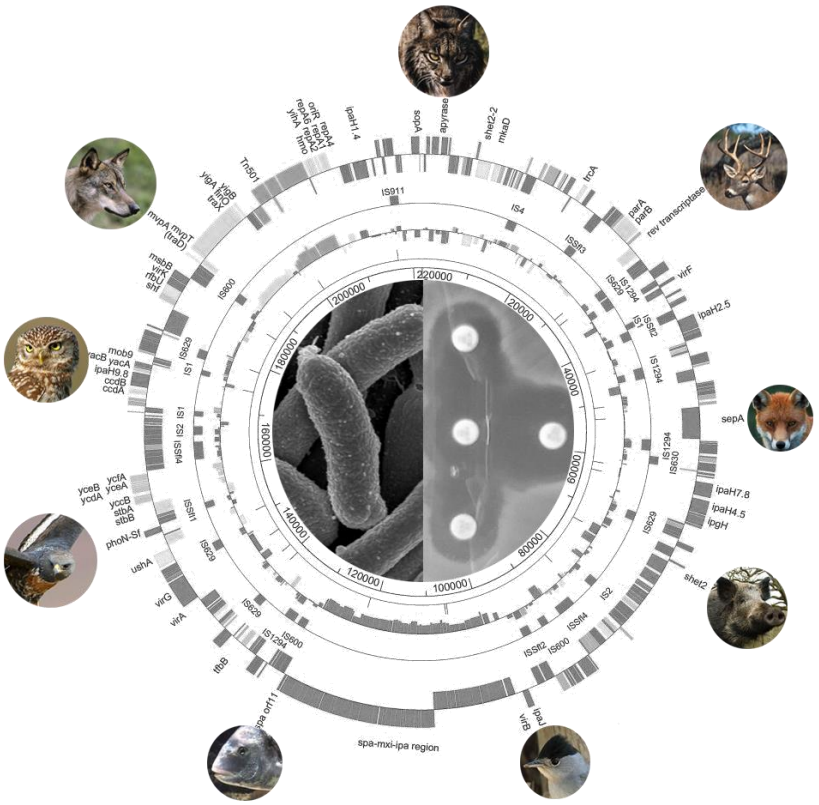
Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Coorientador: Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Vila Real, 2017

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Diversidade e estudo de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL isoladas de animais selvagens



Filipe Antunes da Silva Arêde Cristóvão

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Vila Real 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Diversidade e estudo de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL isoladas de animais selvagens

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde

Filipe Antunes da Silva Arêde Cristóvão

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Coorientador: Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Composição do Júri:

_____

_____

_____

_____

_____

Vila Real, 2017

As doutrinas apresentadas no trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.

"We will set down things seen as seen, things heard as heard, so that our book may be an accurate record, free from any sort of fabrication. And all who read this book or hear it may do so with full confidence, because it contains nothing but the truth"

- Marco Polo em "As Viagens" -

Orientador científico:

[Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta]

Departamento de Ciências Veterinárias

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

Coorientador científico:

[Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas]

Departamento de Genética e Biotecnologia

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

Agradecimentos

No seguimento do tema desta dissertação e numa tentativa, quiçá forçada, de fazer uma analogia científica entre as pessoas e as bactérias, existe uma frase que surge rapidamente no pensamento e que se aplica a ambos os casos na perfeição: "You are a product of your environment" (William Clement Stone).

O fenótipo e genótipo apresentado pelas bactérias é o "espelho" do ambiente que as rodeia, sendo alvos de pressão selectiva e influenciadas pela transferência de genes através de elementos móveis entre as mesmas, tudo de forma a se adaptarem aos mais diversos ambientes. De maneira similar, o ser humano reflecte tudo o que o rodeia: as vivências, as convivências e as envolvências; as aventuras, as personagens e os cenários; as experiências, as pessoas e os ambientes. Tudo o que nos envolve, molda e define a nossa personalidade. As viagens que realizamos, os lugares que descobrimos, os recantos que investigamos e as experiências que vivemos. Os livros que exploramos, os filmes que assistimos, a música que sentimos, a arte que observamos. Tudo o que nos envolve, possui um efeito semelhante à pressão selectiva nas bactérias, esculpindo o nosso carácter. Mas, mais importante que as experiências e as vivências, são as pessoas com quem as partilhamos. Num género de "transferência horizontal", as pessoas com que lidamos transformam-nos, com ensinamentos e exemplos, ideias e ideais, gestos e acções. Citando Antoine de Saint-Exupéry, "Cada um que passa em nossa vida, leva um pouco de nós mesmos, e deixa um pouco de si mesmo", tal como na transferência de genes plasmídicos entre bactérias.

Com isto dito, gostaria de manifestar o meu sincero agradecimento e apreço a várias bactérias, peço desculpa, a diversas pessoas, pelo auxílio, compreensão, disponibilidade e atenção manifestada.

Em primeiro lugar, institucionalmente, à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, na pessoa do Magnífico Reitor, Professor António Augusto Fontaínhas Fernandes, pela disponibilidade e facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

À Direcção do Mestrado em Biotecnologia para as Ciências da Saúde, Professora Doutora Paula Martins Lopes e Professora Doutora Estela Bastos Martins de Almeida, e a

toda a equipa educativa que leccionou neste mestrado, pelo rigor científico que sempre incutiram, pela maneira criativa de ensinar e pela constante disponibilidade e cooperação.

À Professora Doutora Patrícia Poeta, como orientadora científica desta dissertação. Pela oportunidade única de trabalhar nesta área e de presenciar outros métodos de trabalho noutro laboratório. Obrigado pela confiança depositada, pelo optimismo constante, pelo entusiamo e ensinamentos transmitidos, e pelo à-vontade que coloca na relação docente-aluno. Um exemplo de perseverança, dedicação e ambição.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas, como coorientador científico desta dissertação. Pelo excelente exemplo de liderança e organização que representa, mantendo um grupo de investigação motivado e unido. Obrigado pelo constante incentivo pela busca de conhecimento, não só científico mas também cultural.

À Professora Doutora Carmen Torres Manrique, da Universidade de La Rioja, Logroño, Espanha, pela maneira acolhedora com que me recebeu na sua equipa de investigação, pela oportunidade concedida, pelo auxílio, pela hospitalidade, pelos ensinamentos e pela amizade.

Um imenso obrigado à família do "Labo 229" da Universidade de La Rioja. Ainda me recordo vivamente dos primeiros dias em que cheguei a falar inglês, com receio que ninguém compreendesse o meu "portuñol". Por sorte ou acaso, durante a minha estadia em Espanha tive a oportunidade de privar com pessoas únicas, que combinam inteligência e espírito científico com impressionantes qualidades humanas e que, com enorme prazer, hoje posso chamar de amigos: Carmencita, Puala, Dani, Roci, Andrea, Sara, Miri, Quique, Nerea, Marina, Gerardo, Elena, Sarra e Elaa. Obrigado pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela amizade, pelos momentos divertidos e pelas noites de Laurel e Panorama. Serão sempre um exemplo de espírito jovem, curioso e científico, conjugado com profissionalismo, optimismo e alegria no trabalho, mesmo em momentos difíceis. "Gracias por una estancia de puta madre".

Não poderia deixar de agradecer também ao Luís, ao Alex, ao Monteiro, ao Nuno, ao Tiago, ao Pedro, ao Júlio e à Catarina, pela orientação, pela simpatia e pelos ensinamentos e conselhos transmitidos. Um especial agradecimento à Margarida pela amizade, pela ajuda e ensinamentos no decorrer do trabalho e pelo auxílio precioso na minha adaptação em solo espanhol.

À “família” GCVR, porque ali aprendi, ali cresci e ali fiz amizades para a vida. Ao Luís, ao Jon, à Isabel e à Anna, exemplos de profissionalismo, sacrifício e espírito de equipa. Ao João Matos, pelos valores humanos transmitidos, pelo conhecimento partilhado e pela amizade, o mais profundo obrigado.

Aos que me acompanharam desde bem pequeno, à Gang de 90, na pessoa do nosso ‘querido’ líder, João Santos. E à minha Mila, que sempre esteve, está e estará comigo.

Por fim, mas não menos importante, o meu mais sincero agradecimento a toda a minha família. À Cristina, ao Francisco, ao Pedro e à Sara, ao Filipe e ao André por serem fortes, inteligentes, aventureiros, destemidos, exigentes, criativos e determinados, e por me ensinarem e me fazerem ver que também posso ser assim. Obrigado pelos conselhos, pelas orientações, pelas instruções, pelas macacadas, pelas brincadeiras, pelo carinho e pela amizade. Crescer não é coisa fácil, mas com vocês tudo é mais simples e divertido. Ao mais novo membro da família, o Artur, pelas brincadeiras, pela alegria e pela curiosidade contagiante. Ao Pai Artur e à Mãe Teresa, pelo exemplo que representam como seres humanos, como pais, como casal, como profissionais. Obrigado pelo apoio, pelo ânimo, pelas lições e conselhos, pelo carinho e mimo, pela paciência e compreensão. Quando fôr grande quero ser como vocês!

À Sara, pela paciência, pela cumplicidade, pelo amor, pela alegria, pelo ânimo, pelo incentivo e pelo esforço de estar sempre perto apesar da distância.

Esta dissertação tem uma “pitada” do meu trabalho e sabedoria e um pouco de todos vocês, muito obrigado.

Diversidade e estudo de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL isoladas de animais selvagens

Resumo

Os plasmídeos são elementos importantes na mobilidade dos genes de resistência aos antibióticos, como os que codificam beta-lactamases de largo espectro (ESBL), que são de elevada importância clínica. Isolados de *E. coli* produtoras de ESBL, estão altamente disseminados nos hospitais em todo o mundo e de forma semelhante e já foram detectados em animais selvagens no meio-ambiente. Isolados de *E. coli* positivos para a produção de ESBL das classes CTX-M, TEM e SHV (n=53) foram recuperados em amostras fecais de animais selvagens em estudos prévios, e o seu fenótipo e genótipo de resistência aos antibióticos foi também determinado previamente nesses estudos. O objectivo do presente estudo foi determinar a sua diversidade clonal através de electroforese em campo pulsado (PFGE) e verificar a transferência de determinantes de resistência entre as estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL e uma estirpe receptora específica, através de conjugação, bem como determinar plasmídeos de resistência nos dadores e transconjugantes obtidos.

Neste estudo foram incluídos cinquenta e três isolados de *E. coli* de diferentes origens: de lobo (n=14), dourada (n=10), lince ibérico (n=9), javali (n=8), aves de rapina (n=4), raposa (n=3), aves selvagens dos Açores (n=2), veado (n=2) e coruja (n=1), e contendo os genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (n=18), $bl_{a\text{CTX-M-1}}$ (n=12), $bla_{\text{TEM-52}}$ (n=9), $bla_{\text{TEM-1}}$ (n=15) e $bla_{\text{SHV-12}}$ (n=17). As estirpes pertenciam aos grupos filogenéticos A (n=23), B1 (n=20) e D (n=10). Todos os isolados foram submetidos a electroforese em campo pulsado (PFGE) utilizando a enzima *Xba*I. A maioria apresentou padrões de PFGE diferentes, sendo possível detectar 44 padrões distintos. Vinte e nove isolados foram então seleccionadas com diferente padrão de PFGE, tipo de ESBL e com diferente origem e todas apresentando susceptibilidade à rifampicina. Desta selecção, os isolados pertencentes ao grupo filogenético D (n=8) foram submetidos a tipificação de sequências *multilocus* (MLST), e foram observados quarto STs distintos: ST69, ST115, ST117 e ST2001. A selecção de 29 isolados possuía os genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (10 isolados); $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (8 isolados); $bla_{\text{TEM-52}}$ (5 isolados); $bla_{\text{TEM-1}}$ (8 isolados); e $bla_{\text{SHV-12}}$ (8 isolados). Vinte e um isolados transferiram os genes ESBL através de conjugação para a estirpe receptora *E. coli* CSH26 (lactose negative, resistente à rifampicina e sem plasmídeos).

A análise dos plasmídeos foi realizada nos dadores e nas estirpes transconjugantes. Foram observados entre um e seis replicões distintos nos dadores, sendo os mais frequentes, IncK (17 isolados), IncI1 (14 isolados) and IncFIB (12 isolados). O replicão IncI1 foi identificado em 13 transconjugantes obtidos a partir de estirpes dadoras com os genes CTX-M-1, CTX-M-14, TEM-1, TEM-52 e SHV-12. Os genes ESBL são facilmente transferidos através de conjugação para outras estirpes de *E. coli* e é possível que os plasmídeos IncI1 tenham um papel importante no processo de transferência.

Palavras-chave: Animais selvagens, *E. coli* produtora de ESBL, PFGE, MLST, Plasmídeos, Conjugação.

"Diversity and study of plasmid content of ESBL-producing *Escherichia coli* recovered from wild animals"

Abstract

Plasmids are important elements for the mobilization of antibiotic resistance genes, as those encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), and of great clinical relevance. ESBL-producing *E. coli* isolates are largely disseminated in hospitals all over the world and have also been detected in animals and in the environment. ESBL-positive *E. coli* isolates of the CTX-M, TEM and SHV classes (n=53) have been recovered from wild animals in previous studies and their phenotype and genotype of antibiotic resistance have been previously determined. The purpose of the present study was to determine their clonal diversity by pulsed-field-gel-electrophoresis (PFGE), and to verify the transferability of resistance determinants in these ESBL-positive *E. coli* isolates to a specific receptor strain by conjugation, as well as to detect R plasmids in donors and transconjugants.

Fifty-three ESBL-positive *E. coli* isolates recovered from Iberian wolf (n=14), gilthead seabream (n=10), Iberian lynx (n=9), wild boar (n=8), birds of prey (n=4), fox (n=3), wild birds from Azores (n= 2), deer (n=2), and owl (n=1), and carrying the genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (n=18), $bl_{a\text{CTX-M-1}}$ (n=12), $bla_{\text{TEM-52}}$ (n=9), $bla_{\text{TEM-1}}$ (n=15) and $bla_{\text{SHV-12}}$ (n=17) were included in this study. Isolates were ascribed to the phylogenetic groups A (n=23), B1 (n=20) and D (n=10). All these isolates were submitted to PFGE analysis with *Xba*I enzyme. Most of them showed unrelated patterns with the detection of 44 different PFGE patterns. Twenty-nine of these strains were selected as representative, showing different PFGE, type of ESBL and origin, and all of them presented rifampicin susceptibility. From this selection, the isolates ascribed to the phylogenetic group D (n=8) were submitted to *multilocus* sequence typing (MLST), and four different ST's were detected: ST69, ST115, ST117 and ST2001. The selection of 29 strains carried the genes $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (10 strains); $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (8 strains); $bla_{\text{TEM-52}}$ (5 strains); $bla_{\text{TEM-1}}$ (8 strains); and $bla_{\text{SHV-12}}$ (8 strains). Twenty-one isolates transferred by conjugation the ESBL gene to *E. coli* CSH26 receptor strain (lactose-negative, rifampicin-resistant, non plasmidic). Plasmid replicon typing was performed in donor and transconjugant isolates. From one to six different plasmid replicon types were detected in donor strains being IncK (17 strains), IncI1 (14 strains) and IncFIB (12 strains) the most frequent ones. A IncI1 plasmid was detected in 13 transconjugants obtained from donor strains carrying genes

encoding CTX-M-1, CTX-M-14, TEM-52, TEM-1 and SHV-12. ESBL genes can be easily transferred by conjugation to other *E. coli* and IncI1 plasmids might have an important role in this mobilization process.

Keywords: Wild animals, ESBL-producing *E. coli,* PFGE, MLST, Plasmids, Conjugation.

Resumo Gráfico | *Graphical Abstract*

❶ **Lobo Ibérico** (Goncalves *et al.* 2012b)

❷ **Raposa** (Costa *et al.* 2006; Radhouani *et al.* 2013a)

❸ **Lince Ibérico** (Goncalves *et al.* 2012a)

❹ **Javali** (Poeta *et al.* 2009)

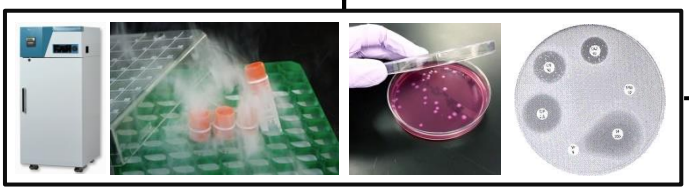
❺ **Veado** (Costa *et al.* 2006)

❻ **Dourada** (Sousa *et al.* 2011)

❼ **Aves Açores** (Silva *et al.* 2011)

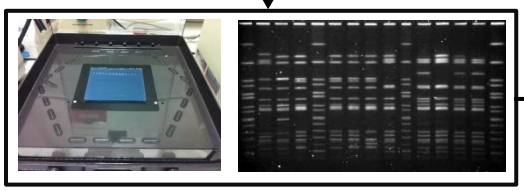
❽ **Ave de rapina** (Costa *et al.* 2006)

❾ **Coruja** (Costa *et al.* 2006)



1ª fase [53 isolados]

Isolados de *E. coli* em meio de leite guardadas a -80ºC | Antibiogramas

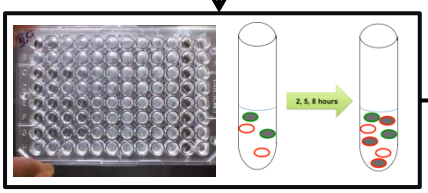


2ª fase [44 isolados]

Electroforese em campo pulsado para identificar e seleccionar clones diferentes

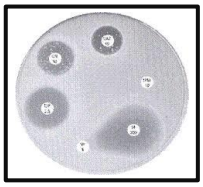
3ª fase [29 isolados]

Selecção dos clones com diferente padrão de electroforese, diferente β-lactamase e diferente origem | MLST ("*multilocus sequence typing*")

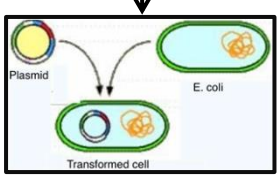


4ª fase [21 trans-conjugantes]

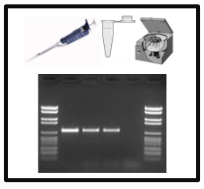
Conjugação | CMI (Concentração mínima inibitória)



Antibiogramas Transconjugantes



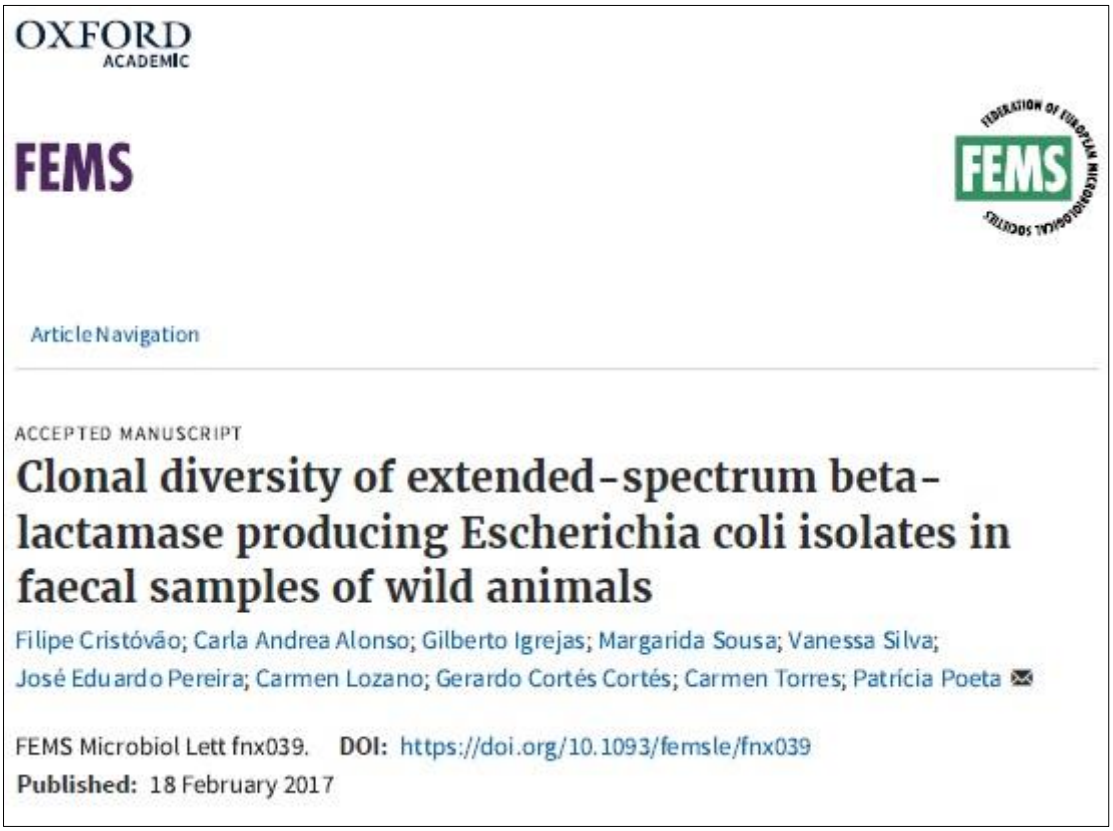
Estudo Plasmídeos *E. coli*



Extracção ADN | PBRT (PCR *based replicon typing*)

Artigo publicado resultante desta investigação científica:

Filipe Cristóvão, Carla Andrea Alonso, Gilberto Igrejas, Margarida Sousa, Vanessa Silva, José Eduardo Pereira, Carmen Lozano, Gerardo Cortés Cortés, Carmen Torres, Patrícia Poeta; Clonal diversity of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of wild animals. *FEMS Microbiol Lett* 2017 fnx039. doi: 10.1093/femsle/fnx039



OXFORD ACADEMIC

FEMS

Article Navigation

ACCEPTED MANUSCRIPT

Clonal diversity of extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli isolates in faecal samples of wild animals

Filipe Cristóvão; Carla Andrea Alonso; Gilberto Igrejas; Margarida Sousa; Vanessa Silva; José Eduardo Pereira; Carmen Lozano; Gerardo Cortés Cortés; Carmen Torres; Patrícia Poeta

FEMS Microbiol Lett fnx039. **DOI:** https://doi.org/10.1093/femsle/fnx039
Published: 18 February 2017

Índice

Capítulo 1 – Introdução 3
1.1 Breve História dos Antibióticos e Respectivas Resistências 3
1.2 A Transversalidade da Resistência aos Antibióticos 9
1.3 Resistoma Antibiótico 13
1.4 Bactérias Indicadoras da Resistência aos Antibióticos 17
1.4.1 *Escherichia coli* como bactéria indicadora da resistência aos antibióticos 18
1.4.1.1 Identificação e classificação filogenética das estirpes de *Escherichia coli* 19
1.4.1.2 Resistência aos antibióticos em *Escherichia coli* produtora de β-lactamases de largo espectro 22
1.5 Genética Aplicada à Resistência aos Antibióticos 27
1.5.1 Elementos genéticos de aquisição e transferência de genes 30
1.5.1.1 Plasmídeos 31
1.5.1.2 Transposões e sequências de inserção 32
1.5.1.3 Integrões e cassetes génicas 34
1.6 Presente e Futuro da Resistência aos Antibióticos 36
1.6.1 Alternativas ao uso de antibióticos 39
1.7 Associação das Técnicas, PFGE, MLST, Conjugação e PBRT 41
Capítulo 2 – Objectivos 47
Capítulo 3 – Material e Métodos 51
3.1 Isolados de *Escherichia coli* 51
3.2 Estudo da Sensibilidade aos Antibióticos 53
3.2.1 Classes de antibióticos testadas 53
3.2.2 Determinação da sensibilidade aos antibióticos 54
3.2.2 Determinação fenotípica da produção de β-lactamases de largo espectro 55
3.3 Caracterização Genotípica dos Isolados 56
3.3.1 Extracção de ADN 56
3.3.2 Quantificação de ADN 57
3.3.3 Reacção em cadeia pela polimerase (PCR, "*polymerase chain reaction"*) 58
3.3.3.1 *Primers* e condições de PCR utilizados 59
3.3.4 Electroforese em gel de agarose 61
3.4 Sequenciação 63

3.5 Electroforese em Campo Pulsado (PFGE) 65
3.6 Cálculo da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para Selecção de Estirpes Dadoras 67
3.7 Transferência de Genes de Resistência Através de Conjugação 70
3.8 Tipificação de Plasmídeos Através de PCR (PBRT-"PCR-*based replicon typing*")..... 71
Capítulo 4 – Resultados 77
4.1 Selecção dos Isolados [primeira fase] 77
4.1.1 Caracterização genotípica 81
4.2 Electroforese em Campo Pulsado (PFGE) [segunda fase] 83
4.3 Tipificação de Sequência *Multilocus* (MLST, "*multilocus sequence typing*") e Selecção de Estirpes [terceira fase] 86
4.4 Diversidade de Plasmídeos em Estirpes de *Escherichia coli* Produtoras de ESBL [quarta fase] 89
4.4.1 Selecção de estirpes dadoras através da concentração mínima inibitória (CMI) 90
4.4.2 Estirpes transconjugantes obtidas após o protocolo de conjugação 91
4.4.3 Caracterização fenotípica e plasmídica das estirpes transconjugantes obtidas 93
Capítulo 5 - Discussão 99
Capítulo 6 - Conclusões 117
Referência Bibliográficas e Leituras Adicionais 125
Anexos 141
A. Meios de Cultura 141
B. Soluções Tampão 141
C. Calendarização PFGE 142

Índice de Tabelas

Tabela 1 Cronograma da utilização de novos antibióticos 8
Tabela 2 Lista de bactérias patogénicas prioritárias.....37
Tabela 3 Estratégias para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos 40
Tabela 4 Proveniência e número de amostras fecais de animais selvagens analisadas.....52
Tabela 5 Antibióticos testados em *E. coli* e respectivo valor dos halos de inibição 53
Tabela 6 Volumes e concentrações dos reagentes usados nas reacções de PCR 59
Tabela 7 Sequências nucleotídicas dos primers de PCR para a determinação dos grupos filogenéticos em *Escherichia coli* 60
Tabela 8 Sequências nucleotídicas dos primers de PCR para a amplificação de 3 dos 7 genes *housekeeping* para a tipificação por MLST 60
Tabela 9 Continuação das sequências nucleotídicas dos primers de PCR para a amplificação de 4 dos 7 genes *housekeeping* para a tipificação por MLST.....61
Tabela 10 Relação entre a concentração de agarose no gel de electroforese e tamanho do amplicão a ser analisado 61
Tabela 11 Recomendações da empresa *Beckman Coulter Genomics* 63
Tabela 12 Volumes e concentrações dos reagentes usados nas reacções de PBRT.....72
Tabela 13 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 1 para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al.*, 2005) 72
Tabela 14 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 2 para o estudo de plasmídeos.....73
Tabela 15 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 3 para o estudo de plasmídeos.....73
Tabela 16 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 4 para o estudo de plasmídeos.....73
Tabela 17 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 5 para o estudo de plasmídeos.....74
Tabela 18 Sequências nucleotídicas dos primers das três reacções de PCR simples para o estudo de plasmídeos.....74
Tabela 19 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de diferentes espécies de animais selvagens 78

Tabela 20 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de javalis selvagens 78
Tabela 21 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de douradas 79
Tabela 22 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de aves dos Açores 79
Tabela 23 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de lobo ibérico 80
Tabela 24 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de raposa vermelha 80
Tabela 25 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de lince Ibérico 81
Tabela 26 Determinação do grupo filogenético dos oito isolados de *Escherichia coli* 82
Tabela 27 Análise dos padrões de PFGE obtidos do primeiro gel de electroforese em campo pulsado 84
Tabela 28 Análise dos padrões de PFGE obtidos do segundo gel de electroforese em campo pulsado 84
Tabela 29 Análise dos padrões de PFGE obtidos do terceiro gel de electroforese em campo pulsado 84
Tabela 30 Conjunto de 29 isolados seleccionados na terceira fase 88
Tabela 31 Análise das sequências tipo dos 8 isolados do grupo filogenético D através de MLST 89
Tabela 32 Medição da CMI dos 29 isolados seleccionados na fase anterior 90
Tabela 33 Contagem das colónias transconjugantes em placas de agar MacConkey 92
Tabela 34 Comparação das estirpes de *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases utilizadas como dadoras e as estirpes transconjugantes (TC) 94

Índice de Figuras

Figura 1 Representação do resistoma antibiótico e dos seus constituintes.....14
Figura 2 Nova visão do resistoma antibiótico.....15
Figura 3 Chave dicotómica para a classificação dos grupos filogenéticos em *Escherichia coli*, ...21
Figura 4 Número de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL divididos por gene codificador de β-lactamases.....25
Figura 5 Distribuição das β-lactamases de largo espectro do tipo CTX-M pela Europa.....26
Figura 6 Mecanismos de transferência horizontal de genes em bactérias.....29
Figura 7 Composição do plasmídeo pBR322.....32
Figura 8 Estruturas esquematizadas das sequências de inserção (IS) e dos transposões.....33
Figura 9 Diagrama do transposão complexo resistente Tn*3*.....34
Figura 10 Estrutura esquematizada de um integrão classe 1 e da aquisição de uma cassete génica.....35
Figura 11 Lista de 10 normas/recomendações feitas pelo plano estratégico "Proyecto Resistencia Zero".....39
Figura 12 Isolado com fenótipo positivo para produção de β-lactamases de largo espectro ..55
Figura 13 Gráfico com picos de comprimento de onda da fluorescência numa amostra de ADN.....64
Figura 14 Replicador de Steers ou inoculador múltiplo.....69
Figura 15 Divisão dos 53 isolados por número (%), espécie de animal e por estudo.....77
Figura 16 Número de isolados (%) por grupo filogenético.....82
Figura 17 Dendrograma com as 44 amostras seleccionadas após análise dos padrões de electroforese em campo pulsado.....84
Figura 18 Dendrograma com os 29 isolados seleccionados após análise dos padrões de electroforese em campo pulsado, os diferentes tipos de ESBL e a sua espécie de origem.....86
Figura 19 Divisão dos 29 isolados seleccionados, por grupo filogenético e por espécie de origem.....87
Figura 20 Número de isolados com distintas combinações de genes codificadores de β-lactamases entre os 29 isolados seleccionados para estirpes dadoras.....91
Figura 21 Divisão dos 21 isolados finais por animal de origem.....93
Figura 22 Comparação dos plasmídeos nas estirpes dadoras e transconjugantes.....95

Lista de Abreviaturas

€	Euro
%	Percentagem
=	Igual
≤	Menor ou igual a
≥	Menor ou igual a
®	Marca registada
™	Marca registada
ºC	Graus Celsius
β	Beta
ADN	Ácido desoxirribonucleico (DNA, "*Desoxiribonucleic Acid*")
AMC	Amoxicilina + ácido clavulânico
API	Índice de perfil analítico ("*Analytical Profile Index*")
AZT	Aztreonam
BHI	Meio de cérebro e coração ("*Brain-heart Infusion*")
bla	Gene codificador de β-lactamases de largo espectro
BrEt	Brometo de etídeo
CARD	Base de dados abrangente da resistência aos antibióticos ("*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*")
CDC	Centro americano para o controlo e prevenção de doenças ("*Center for Disease Control and Prevention*")
CHL	Cloranfenicol
***chu*A**	Gene para identificação de grupos filogenéticos
CI	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de padrões clínicos e de laboratório ("*Clinical and Laboratory Standards Institute*")
ClustalW2	Ferramenta bioinformática de análise e comparação de sequência múltiplas
CMI	Concentração mínima inibitória
CTX	Cefotaxima
CTZ	Ceftazidima
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
ECCMID	Congresso europeu de microbiologia clínica e doenças infecciosas ("*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*")
E. coli	*Escherichia coli*
ECDC	Centro europeu para a prevenção e controlo de doenças ("*European Centre for Disease Prevention and Control*")
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético ("*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*")
EMBOSS	*Site* de disponibilização de ferramentas de análise bioinformática ("*European Molecular Biology Open Software Site*")
ESBL	β-lactamases de largo espectro ("*Extended Spectrum β-lactamases*")

GE	Gentamicina
Inc	Grupo de incompatibilidade
Kpb	Quilo pares de base (Kbp, "*Kilo Base Pair*")
K. pneumoniae	*Klebsiella pneumoniae*
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
McFarland	Escala que representa concentrações de bactérias por mL
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MH	Meio de Mueller-Hinton
MLST	Tipificação de sequência *multilocus* ("*Multilocus Sequence Typing*")
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina ("*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*")
NA	Ácido nalidíxico
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização mundial de saúde
pb	Par de base (bp, "*Base Pair*")
PBRT	Tipificação de plasmídeos através de PCR ("PCR-*based Replicon Typing*")
PCR	Reacção em cadeia por acção da polimerase ("*Polimerase Chain Reaction*")
PFGE	Electroforese em campo pulsado ("*Pulsed Field Gel Electrophoresis*")
pH	Potencial hidrogénico
Rif	Rifampicina
rpm	Rotações por minuto
SE	Tampão de NaCl e EDTA
spp	Espécie
ST	Estreptomicina
ST	Sequência tipo
SXT	Sulfametoxazol/trimetoprim
TB	Tobramicina
TBE	Solução tampão de Tris, ácido bórico e EDTA
TC	Transconjugantes
TE	Tampão de Tris e EDTA
TE	Tetraciclina
T_m	Temperatura de *melting*
TSI	Teste do triplo açucar-ferro ("*Triple Sugar Iron Test*")
***tsp*E4.C2**	Gene para identificação de grupos filogenéticos
UE	União Europeia
UR	Universidade de La Rioja
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
UV	Ultravioleta
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde ("*World Health Organization*")

***yja*A**	Gene para identificação de grupos filogenéticos

Introdução

“Tell me and I forget, teach me and I may remember, involve me and I learn.”

- Benjamin Franklin -

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Breve História dos Antibióticos e Respectivas Resistências

De forma a compreender aprofundadamente os princípios da resistência antimicrobiana, justifica-se, realizar uma viagem ao passado e descobrir a origem e evolução da utilização dos antibióticos ao longo do tempo.

Para além da origem grega, αντί - anti + βιοτικός - biotikos, "contra um ser vivo", obviamente antiga, também a sua utilização remonta-nos para civilizações bastante remotas. Iniciamos esta viagem no tempo, e retrocedemos até ao ano de 1550 a.C. e à civilização egípcia.

Relatos contidos num dos mais antigos e importantes tratados médicos da história, o Papiro Ebers, contam pormenorizadamente a utilização de uma mistura de mel, banha de porco e fibra de algodão de forma a criar um género de curativo para cobrir feridas (McKenna e McKenna 1998), algo curioso, pois hoje é amplamente reconhecido o poder curativo do mel, bem como a sua capacidade de eliminar algumas bactérias, devido ao elevado teor em peróxido de hidrogénio (produzido pela enzima glicose oxidase). Relatos com cerca de 2000 anos, descrevem ainda a utilização, em diversos locais, como o Egipto, a China e a Grécia, de pão velho e colonizado por fungos como tentativa de travar infecções cutâneas (Keyes *et al.* 2008).

Apesar de estas civilizações antigas utilizarem este tipo de "medicina tradicional" com a crença e o intuito de satisfazer os deuses responsáveis pela doença, hoje em dia podemos facilmente justificar a eficácia destes remédios caseiros através da sua composição química e de alguns metabolitos presentes nestas misturas.

Contrariando a crença popular de que os antibióticos são uma invenção recente, e apoiando o facto de que a produção de pequenas moléculas com capacidade antimicrobiana ocorre de forma natural na natureza, investigações recentes detectaram vestígios de tetraciclina (Bassett *et al.* 1980), um dos antibióticos ainda hoje utilizados, em esqueletos humanos datados de 350-550 encontrados na Núbia Sudanesa, algo que apenas pode ser explicado através de uma dieta rica em materiais que contenham este antibiótico, como por

exemplo cerveja fabricada com grãos infectados com *Streptomyces*, como sugerem os investigadores (Nelson *et al.* 2010). Para além deste estudo, outro caso de exposição à tetraciclina foi detectado em esqueletos humanos do período Romano no Egipto, através da análise de fluorocromos (Cook *et al.* 1989). Ambos os estudos sugerem que o consumo deste antibiótico natural teve um efeito protector positivo nas populações em causa, visto existirem raros vestígios de infecções nos indivíduos analisados.

As características únicas da tetraciclina, como a forte capacidade quelante e o facto de ser facilmente incorporada na parte mineral do osso, bem como no esmalte dos dentes, fazem com que seja facilmente detectada e que funcione como marcador metabólico (Aminov 2010). Assim sendo, a detecção de outros antibióticos em civilizações antigas torna-se bastante difícil, e só é possível através da análise de relatos históricos e de costumes tradicionais. Foi através da análise de tradições históricas que se desenvolveram mais dois estudos interessantes: o primeiro, sobre a capacidade antibiótica dos solos vermelhos da Jordânia (Falkinham *et al.* 2009), sendo relevante referir que a antiga (e actual) utilização da terra como alternativa farmacêutica para infecções cutâneas levou à descoberta de bactérias produtoras de antibióticos como a actinomicina; e o segundo focado nas propriedades antimicrobianas de diversas plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa (Wong *et al.* 2010).

Todos estes estudos comprovam e reconhecem que a resistência aos antibióticos existe desde a existência de antibióticos e muito antes de o Homem começar a produzi-los em massa. Contudo, e essa é a grande preocupação actualmente, pois a existência de bactérias resistentes nunca existiu em tão larga escala. A análise filogenética de diferentes genes de resistência comprova a presença deste tipo de material genético na natureza muito antes da chamada "época dourada" dos antibióticos (Aminov 2009), como é o caso dos estudos evolutivos sobre β-lactamases em *Klebsiella oxytoca*, que mostram que estas enzimas têm vindo a evoluir neste hospedeiro durante mais de 100 milhões de anos (Fevre *et al.* 2005).

Continuando a viagem pela história dos antibióticos e da evolução de bactérias resistentes, chegamos a 1888, ano em que E. Freudenreich, cientista alemão, conseguiu isolar um produto bacteriano que possuía propriedades antibacterianas. O alemão observou que o pigmento azul libertado por culturas de *Bacillus pyocyaneus* (hoje em dia *Pseudomonas aeruginosa*) conseguia travar o crescimento de algumas bactérias patogénicas, porém, após um ano, e depois dos testes clínicos, Rudolf Emmerich e Oscar Loew, também de

nacionalidade alemã, provaram que a "piocianase" era instável e tóxica para os pacientes, adiando assim a produção e o desenvolvimento de um fármaco antibacteriano eficaz (Emmerich e Löw 1899; Hays *et al.* 1945; Levy 2002).

Entrando na denominada era dos antibióticos, um dos principais fundadores foi um médico também alemão, Paul Ehrlich, que investigou intensivamente a produção de uma "bala mágica" ("magic bullet") que fosse capaz de selectivamente eliminar bactérias patogénicas sem efeitos secundários nos hospedeiros. Baseando-se na observação de alguns corantes que surgiram na época, como a anilina, que conseguiam corar selectivamente alguns microorganismos, Ehrlich iniciou em 1904 um estudo massivo em busca de um fármaco contra a sífilis, doença que era incurável na altura. Juntamente com um químico, Alfred Bertheim, e um bacteriologista, Sahachiro Hata, basearam-se num fármaco altamente tóxico, o Atoxil, e testaram-no em coelhos infectados com sífilis (Ehrlich e Halta 1910). Após numerosos fracassos, em 1910, Ehrlich e os seus colaboradores descobriram a fórmula final do composto 606, mais tarde denominado de *salvarsan*, um produto arsénico sintético, capaz de curar as cobaias infectadas com sífilis. Assim nasceu o primeiro agente quimioterapêutico, que teve bastante êxito, tal como o seu sucessor menos tóxico, o *neosalvarsan*, até ao surgimento, em 1940, da penicilina (Aminov 2010).

Apesar das notáveis descobertas de Ehrlich, o primeiro antibiótico comercialmente disponível, foi o Prontosil. Sintetizado em 1932 pelos químicos Josef Klarer e Fritz Mietzsch e testado em ratos por Gerhard Domagk (Tabela 1) (Domagk 1935), este fármaco, que curou várias doenças, como meningites e pneumonias, foi o precursor das chamadas sulfonamidas, um importante grupo de antibióticos sintéticos, levando um dos seus descobridores, Domagk, a receber o prémio Nobel em 1947. A sua produção de baixo custo e a falta de patente, levou a uma rápida e vasta expansão da sua venda, o que hoje em dia se reflecte num dos casos mais alarmantes de disseminação de resistências, as bactérias resistentes a sulfonamidas (Aminov 2010).

Mas o verdadeiro marco histórico da "era dourada" dos antibióticos foi a descoberta da penicilina, por Alexander Fleming, em 1928 (Tabela 1). Este biólogo escocês descobriu este antibiótico de maneira fortuita, quando observou que o fungo *Penicillium notatum*, que contaminára uma cultura de *Staphylococcus aureus*, inibia o crescimento da bactéria (Fleming 1929). Contudo, e devido à falta de apoio da comunidade científica, a purificação de quantidades suficientes de penicilina para ensaios clínicos só aconteceu em 1940 pelas mãos

de dois investigadores de Oxford, Howard Florey e Ernest Chain (Chain *et al.* 2005). Após a descoberta dos protocolos de purificação, a produção em massa da penicilina chegou a tempo de salvar centenas de vidas das tropas aliadas durante a Segunda Guerra Mundial (Abraham 1983). Esta descoberta levou os três investigadores a receber o prémio Nobel da Medicina em 1945.

Baseando-se nas suas observações laboratoriais, Fleming previu e alertou que o abuso do consumo da penicilina levaria à propagação de bactérias resistentes ao antibiótico, visto que as bactérias conseguiam transmitir genes horizontalmente. Apesar dos avisos e das precauções recomendadas por este investigador, a penicilina tornou-se livremente disponível ao público durante alguns anos, até ser necessária uma prescrição médica (Aminov 2010). Este uso exacerbado da penicilina levou as companhias farmacêuticas a desenvolver outros antibióticos derivados, como a meticilina. Apesar de suprir inicialmente as falhas que a penicilina tinha, a sua utilização exagerada levou a um dos casos mais preocupantes de infecções da actualidade, como *Staphylococcus aureus*, resistente à meticilina (MRSA) (Tabela 1).

De forma quase simultânea à descoberta e prescrição dos primeiros antibióticos em humanos, iniciou-se, de forma casual, a sua utilização como promotores de crescimento na produção animal. Decorria o ano de 1948 quando Robert Stokstad, um nutricionista veterinário, e Thomas Jukes, um bioquímico, ambos trabalhadores da companhia farmacêutica Lederle, principiaram um estudo com o objectivo de desenvolver um "factor proteico animal". Focados em vários estudos prévios com vitamina B12 como promotora do crescimento, e trabalhando nos laboratórios de uma empresa farmacêutica (os laboratórios Lederle descobriram a primeira tetraciclina), os dois investigadores descobriram que as cubas de *Streptomyces aureofaciens*, utilizadas para produzir o antibiótico clorotetraciclina, continham restos celulares com elevadas quantidades de vitamina B12 (Stokstad *et al.* 1949). Após introduzirem este suplemento fermentado de *S. aureofaciens* na dieta de um conjunto de pintos, Stokstad e Jukes constataram que os animais cresciam mais rapidamente em relação aos animais alimentados apenas com extracto de fígado, fonte natural de vitamina B12 (Stokstad e Jukes 1950). Como as quantidades de antibiótico utilizados como factores de crescimento em animais e como medicação profiláctica eram sub-terapêuticas, desde esse ensaio e durante muitos anos, a indústria alimentar usou e abusou da sua aplicação (Prescott e Dowling 2013). A utilização dos antibióticos com este propósito foi proibida em 2006 na

Comunidade Europeia [Regulamento (CE) Nº 1831/2003]. Este decreto diz que "os antibióticos, com excepção dos coccidiostáticos e dos histomonostáticos, só podem ser comercializados e utilizados como aditivos para a alimentação animal até 31 de Desembro de 2005; a partir de 1 de Janeiro de 2006, essas substâncias são suprimidas do registo".

Com a "era dourada" dos antibióticos, entre 1950 e 1970, com o surgimento de dezenas de novos fármacos, como a estreptomicina e a ampicilina, veio também a era dourada das resistências (Tabela 1). Observações publicadas num estudo de 1940, antes da utilização massiva da penicilina, já sugeriam a existência de bactérias capazes de eliminar o antibiótico através de degradação enzimática (Abraham e Chain 1988). Contudo, e durante algum tempo, os estudos sobre resistências transmitiam uma versão bastante optimista da situação, levando mesmo o cirurgião americano William H. Stewart a declarar, em 1960, o fim das doenças infecciosas: "é hora de fechar o livro sobre as doenças infecciosas e declarar vitória na guerra contra as epidemias" (Sengupta *et al.* 2013).

Toda esta euforia não se prolongou durante muito tempo e começaram a surgir os primeiros casos de resistência a antibióticos em hospitais, onde estes eram mais utilizados. Os primeiros casos de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina surgiram em Londres, pouco despois da sua introdução no mercado. Em 1962 o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi identificado no Reino Unido e seis anos mais tarde nos Estados Unidos da América (Ventola 2015). Vários casos de bactérias multirresistentes em diferentes espécies, como *Escherichia coli*, *Shigella* ou *Salmonella*. foram também identificados entre o final da década de 1950 e o início de 1960 (Levy e Marshall 2004). Os casos de resistência à tetraciclina subiram de 2% em 1950 para uns assustadores 80% em 1990 (Shoemaker *et al.* 2001). E antibióticos como a canamicina, muito utilizado na década de 1950, tornou-se praticamente obsoleto (Criswell 2004; Griffith 1966).

As elevadas taxas de mortalidade devido a infecções com bactérias multirresistentes (aproximadamente 25,000 pacientes por ano na União Europeia), levou a Organização Mundial de Saúde a fazer a seguinte declaração em 2014: "Esta séria ameaça não é uma previsão para o futuro, está a acontecer agora, em todas as regiões do mundo e tem potencial para afectar qualquer pessoa, de qualquer idade, em qualquer país."

Tabela 1. Cronograma da utilização de novos antibióticos e do desenvolvimento de bactérias resistentes (Adaptado de Lewis, 2013 e Wright, 2007)

Classe de Antibiótico	Antibiótico	Descobrimento	Utilização	Observação de Resistência
β-Lactâmicos	Penicilina	1928	1940	1945
Sulfonamidas	Prontosil	1932	1936	1942
Aminoglicosídeos	Estreptomicina	1943	1946	1946
Tetraciclinas	Clorotetraciclina	1944	1952	1950
Cloranfenicóis	Cloranfenicol	1946	1948	1950
Macrólidos	Eritromicina	1948	1951	1955
Glicopéptidos	Vancomicina	1953	1958	1960
Oxazolidinonas	Linezolida	1955	2000	2001
Rifampicinas	Rifampicina	1957	1958	1962
Aminoglicosídeos	Canamicina	1957	1958	1958
β-Lactâmicos	Meticilina	1959	1960	1961
Quinolonas	Ciprofloxacina	1961	1968	1968
Cefalosporinas	Cefalotin	1962	1964	1965
Estreptograminas	Estreptogramina B	1963	1998	1964
Sulfonamidas/ Trimetoprim	Trimetoprim-Sulfametoxazol	1962	1968	1972
Lipopéptidos	Daptomicina	1986	2003	1987
Diarilquinolinas	Bedaquilina	1997	2012	2006

Nas últimas décadas a investigação relativa à resistência aos antibióticos estava principalmente dirigida para as bactérias patogénicas em infecções nosocomiais. Hoje, tendo em conta a pressão selectiva que o Homem provocou através do uso incorrecto dos antibióticos, a capacidade única das bactérias transferirem genes entre si, através de plasmídeos de resistência (R) que podem conter vários genes de resistência, e o facto de as bactérias possuírem resistências intrínsecas, levou os grupos de investigação a abrangerem outros campos de investigação.

Uma definição de resistoma bacteriano foi criada por Gerard Wright, contendo todos os genes que contribuem directa ou indirectamente para a resistência aos antibióticos: os genes de resistência de microorganismos ambientais (resistoma ambiental), os genes de resistência das bactérias patogénicas (clínico), os genes de resistência intrínseca (intrínseco) e os genes que codificam proteínas metabólicas (protorresistência) (Wright 2010a). O alargamento do foco levou também ao desenvolvimento de diversos estudos centrados, não só na medicina humana mas também na veterinária, no meio ambiente e na segurança alimentar (Costa *et al.* 2006; Heuer *et al.* 2011; Saenz *et al.* 2004; Wright 2010a).

Hoje em dia, o fenómeno da resistência aos antibióticos é uma ameaça a nível global, que requer uma abordagem intensiva e transversal, como referia Rustav Aminov em 2010: "é um problema complexo que exige esforços concertados de microbiólogos, ecologistas, profissionais da área da saúde, educadores, legisladores, órgãos legislativos, trabalhadores da indústria agrícola e farmacêutica, e da população em geral. Na verdade, devia ser uma preocupação de todos, porque, no final, há sempre a probabilidade de qualquer um de nós, a qualquer momento, ser infectado com um patogénico resistente a antibióticos" (Aminov 2010).

1.2 A Transversalidade da Resistência aos Antibióticos

O que surgiu primeiro, o antibiótico ou a resistência? Os primeiros estudos relacionados com a existência de genes de resistência foram bastante pragmáticos e conclusivos quanto a esta questão. Previamente à descoberta e introdução dos antibióticos por parte do Homem, vários estudos revelaram a existência de factores de resistência na natureza, em comunidades livres de qualquer pressão farmacológica, como foi o caso da observação, em 1946, de *Escherichia coli* resistente à estreptomicina e tetraciclina, muito antes de estes fármacos serem descobertos e estarem disponíveis para utilização (Gardner *et al.* 1969), o que levava a crer que a fonte mais provável dos tais factores de resistência seria a microbiota ambiental. Podemos então apontar o ambiente e os microorganismo que nele vivem, como a origem de muitos dos genes de resistência existentes, sendo alguns bastante semelhantes aos genes hoje observados em estirpes patogénicas (Canton 2009; Wright 2010b).

Com a evolução da ciência, e da genética em particular, foi possível aprofundar esta análise ambiental aos genes de resistência, e o desenvolvimento da área da metagenómica e das ferramentas de sequenciação, permitiu provar que as bactérias ambientais, principalmente provenientes do solo, mas não só, contêm um vasto número de elementos genéticos capazes de conferir resistência antimicrobiana (Martinez 2012). Todo este novo conhecimento conduz então a outra questão: qual a função destes genes de resistência presentes em hospedeiros em ambiente "virgem", sem pressões selectivas? Abordando esta temática, José Martínez, em 2012, dividiu a evolução dos genes de resistência em duas eras distintas. A primeira, que durou até à utilização de antibióticos por parte do Homem, define os genes de resistência como sendo cromossómicos, e possuíndo diversas funções: desde desintoxicação do próprio antibiótico produzido, passando por funções na biosíntese do próprio antibiótico (Benveniste e Davies 1973), ou na biosíntese da parede celular, como é o caso das beta-lactamases (Jacobs *et al.* 1994), até ao transporte de moléculas sinalizadoras ou desintoxicação de metabolitos (Martinez *et al.* 2009). Assim sendo, é possível que muitos genes de resistência possuam uma função dupla nas bactérias. De forma a introduzir a segunda época na evolução dos genes de resistência, Martínez, afirma ainda que, apesar de um gene plasmídico ser capaz de produzir resistência aos antibióticos num hospedeiro novo, isso não significa que o mesmo gene possua o mesmo efeito no seu hospedeiro de origem (Martinez 2012).

A falta da estrutura bioquímica e do contexto genético num novo hospedeiro, obriga o gene transferido a limitar a sua função à resistência (Baquero *et al.* 2009), fenómeno que pode ser apelidado de exaptação, que é uma adaptação biológica consequente de pressões selectivas. E foi exactamente isso que o Homem fez durante as várias décadas de utilização massiva dos antibióticos, quer na área da medicina humana e veterinária, quer na área ambiental, na agricultura e na pecuária, tornando mais célere o processo evolutivo da segunda era. Análises realizadas através de um arquivo de solos, permitiu observar um aumento significativo de genes de resistência aos antibióticos desde 1940, o que apoia a tese de que a utilização de antibióticos pelos humanos veio contaminar os ecossistemas e acelarar o processo evolutivo dos genes de resistência (Knapp *et al.* 2010).

A transversalidade da resistência antimicrobiana afecta diferentes ecossistemas e cada um com diferentes genes de resistência. A capacidade de transferência dos elementos genéticos móveis com genes de resistência contribui também para uma maior transversalidade, sendo possível observar genes de resistência até em animais selvagens que

teoricamente não teriam qualquer contacto com antibióticos (Costa *et al.* 2006; Martinez 2009; Poeta *et al.* 2009).

Mudamos agora o foco para os animais, visto serem um dos alicerces desta dissertação, mais especificamente os animais selvagens, que representam um grande e importante reservatório de genes de resistência a antibióticos de importância clínica. Concentrados neste facto, vários grupos de investigação, incluindo aqueles nos quais esta tese foi desenvolvida, investigam a existência e prevalência de bactérias multirresistentes em animais selvagens, caracterizando-as geneticamente e analisando os seus mecanismos de transferência genética (Costa *et al.* 2008; Poeta *et al.* 2009; Radhouani *et al.* 2013a). Vários estudos foram também desenvolvidos sobre a responsabilidade humana no aparecimento de genes multirresistentes em populações isoladas. Consensualmente, concluiu-se que a probabilidade de encontrar níveis de resistência maiores em animais selvagens é proporcional à proximidade das populações humanas (Osterblad *et al.* 2001), mostrando que até nestes ecossistemas, de certa maneira "virgens", o uso intensivo de antióticos pelo Homem se fez sentir.

A contaminação de vários ecossistemas com elementos genéticos de resistência, através de um uso excessivo de antibióticos, provocou pressões selectivas que inequivocamente contribuiram para a rápida evolução dos genes de resistência e o desenvolvimento de reservatórios ambientais de resistência aos antibióticos (Allen *et al.* 2010). Desde 1940, o uso de antibióticos de maneira abusiva e muitas vezes sem critério por parte do ser humano, tem contaminado irreversivelmente vários ecossistemas. Nas áreas da medicina humana e veterinária, na agricultura, na indústria alimentar, na pecuária e na aquacultura, os antibióticos foram utilizados com diferentes objectivos, desde a terapeûtica e profilaxia, passando pelos pesticidas na agricultura e pelos produtos de esterilização na indústria e na investigação, até aos produtos de limpeza que são utilizados no quotidiano (Allen *et al.* 2010). Nos animais, os antibióticos foram administrados não só como terápicos, mas também, em doses subterapeûticas, como promotores de crescimento, que preveniam o apareciemento de infecções e promoviam o aumento de peso (Torres e Zarazaga 2002), prática esta que entretanto foi proibida na União Europeia no ano de 2006, como já referido.

O que podemos concluir é que a evolução da resistência aos antibióticos e o estudo desta problemática é altamente complexo, transversal a várias áreas e vários ecossistemas, e dependente de múltiplos factores. Transversal a várias áreas, pois requer esforços concertados

de profissionais de diferentes sectores, não só de médicos e profissionais da saúde, mas também de legisladores, governantes, investigadores, profissionais da área farmaceûtica, como é óbvio, de todos nós consumidores de antibióticos, e até de economistas e profissionais da área das finanças, visto que os custos económicos derivados de infecções através de bactérias multirresistentes são muito elevados, rondando 1.5 biliões de euros todos os anos na União Europeia. Transversal a vários ecossistemas, porque, como já podemos constatar, os genes de resistência podem ser observados nos mais variados ambientes: hospitalar e clínico; em animais selvagens, de companhia e de produção alimentar; na agricultura, nos solos, na água e nos químicos utilizados; e até, surpreendentemente, nas populações mais remotas, sem qualquer contacto com antibióticos ou com civilizações modernas (Bartoloni *et al.* 2009; Pallecchi *et al.* 2007). E por fim, complexo e dependente de vários factores como (Torres 2012):

a) a pressão selectiva criada pelos antibióticos (não só utilizados pelo ser humano mas também sintetizados por alguns microorganismos) sobre as bactérias dos diferentes ecossistemas, bem como a influência selectiva de alguns compostos como metais pesados, detergentes e biocidas presentes no ambiente;

b) a existência do resistoma antibiótico que contem todos os genes que influenciam, directa ou indirectamente, a resistência aos antibióticos, e que está em constante evolução;

c) a capacidade genética das bactérias em captar e transferir genes de resistência através de elementos móveis como os plasmídeos;

d) a fácil incorporação dos genes de resistência em bactérias epidémicas que rapidamente se propagam em ecossistemas específicos, como hospitais e explorações animais;

e) a existência de comunidades bacterianas onde a transferência de genes de resistência ocorre activamente.

Por todos estes factos, a resistência aos antibióticos e o seu estudo são de elevado interesse, não só da comunidade científica, mas da sociedade em geral. De forma a perceber o impacto do uso de antibióticos, a disseminação de genes de resistência e os seus mecanismos genéticos e prever a sua evolução, estudos como o desta dissertação são realizados em diversos ecossistemas, neste caso em animais selvagens. Tudo isto com um objectivo central, bem definido, de desenvolver estratégias de controlo e programas de vigilância à resistência

aos antibióticos em bactérias patogénicas e comensais. Apesar de todos os esforços e investigações, os estudos sobre a resistência aos antibióticos ainda estão numa fase inicial e é importante sublinhar que os genes de resistência levam milhões de anos de avanço relativamente aos nossos conhecimentos, visto que a resistência aos antibióticos é um fenómeno natural que já ocorre há milénios.

Assim sendo, e tentando responder à questão inicialmente proposta, o que parece ter surgido primeiro terão sido os genes de resistência, como resposta genética à presença de compostos tóxicos semelhantes aos antibióticos, muitos deles sintetizados pelas próprias bactérias. E desde a existência de bactérias, há milhões de anos, que os genes de resistência têm evoluído, sendo prova disso as descobertas de genes de resistência em amostras de pergelissolo do Estreito de Bering com 30,000 anos e em amostras recolhidas na Gruta de Lechuguilla no Novo México, que esteve isolada durante quatro milhões de anos (Bhullar *et al.* 2012; D'Costa *et al.* 2011). Resumindo, os estudos nesta área são extremamente importantes e necessários para aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de transferência, manutenção e evolução da resistência aos antibióticos (Martinez 2012).

1.3 Resistoma Antibiótico

O aparecimento e a origem dos genes de resistência, previamente abordado, é, como foi possível verificar, um tema bastante complexo que requer uma abordagem científica apurada. A observação de genes de resistência em estirpes bacterianas do solo, com reduzido ou nulo contacto com antibióticos capazes de provocar alguma espécie de pressão selectiva, despertou o interesse da comunidade científica e deu o mote para o desenvolvimento de novas teorias e novos conceitos, como o resistoma (Canton 2009).

O conceito de resistoma antibiótico surgiu em 2006 com o objectivo principal de compreender a origem, a evolução e a dispersão dos genes de resistência (D'Costa *et al.* 2006). A versão original de resistoma consistia na totalidade dos genes de resistência que directa ou indirectamente contribuiam para a resistência aos antibióticos: os genes de resistência aos antibióticos presentes em estirpes patogénicas, denominado de resistoma clínico; os genes de resistência presentes em estirpes não patogénicas identificadas no ambiente, chamado de resistoma ambiental; os genes intrínsecos presentes nos cromossomas

bacterianos, identificado como resistoma intrínseco; e os percursores de genes de resistência, genes que codificam proteínas metabólicas que através de processos evolutivos poderiam tornar-se genes de resistência, e estes foram denominados de genes de protorresistência (Wright 2010a). O interessante é que estes pequenos resistomas estão todos interligados, através de transferência horizontal entre bactérias e a troca de genes de resistência e os mecanismos de tranferência de genes desenvolvidos pelas bactérias é o que formam o resistoma bacteriano como um todo. Esta visão inicial do resistoma antibiótico é representada na Figura 1, que realça, não a trajectória e a direcção da transferência dos genes de resistência, mas sim a quantidade de genes em cada resistoma (Wright 2010a).

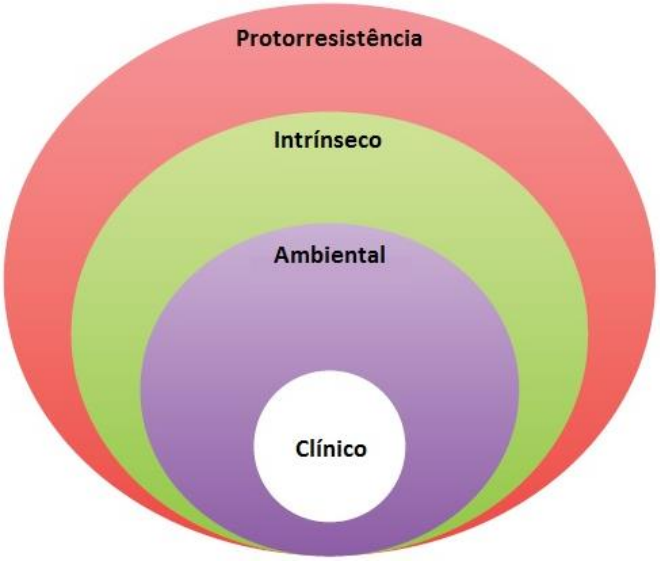


Figura 1 Representação do resistoma antibiótico e dos seus constituintes (Adaptado de Wright, 2010a)

Esta representação do resistoma apresentada por Gerard Wright em 2010, destaca a reduzida quantidade de genes de resistência detectados em bactéria patogénicas, contudo, estas espécies são as mais abordadas em estudos científicos. O panorama actual requer uma perpectiva mais global e exige uma mudança de foco para o resistoma ambiental, pois foi aí que surgiram os primeiros genes de resistência (D'Costa *et al.* 2011). Esta mudança de foco permitirá obter uma maior compreensão das bases moleculares da resistência e possibilitará identificar como evoluem e dispersam rapidamente os genes de resistência (Torres 2012).

Com esta ideia em mente, em 2013 foi criada uma plataforma bioinformática, denominada de "Comprehensive Antibiotic Resistance Database" (CARD), que permite pesquisar, relacionar e comparar dados moleculares e sequências genéticas de genes de

resistência, permitindo facilmente identificar estes genes, fazer associações a diferentes resistomas e prever fenótipos de resistência a partir de determinado genótipo (McArthur e Wright 2015).

Tal como a natureza é dinâmica e está em constante mudança e evolução, também o resistoma antibiótico acompanha esta evolução e este dinamismo. Assim sendo, em 2014 foi sugerida uma visão, não diferente, mas sim complementar, do resistoma antibiótico. Esta nova visão incluiu aos conjunto de genes previamente referidos, os chamados genes 'silenciosos' de resistência, que tal como os genes de protorresistência, não têm um efeito directo no fenótipo de resistência até a sua expressão ser alterada através de mutações (Perry *et al.* 2014). Tal como no conceito anterior de resistoma, também o novo é ilustrado de uma maneira clara e compreensível na Figura 2.

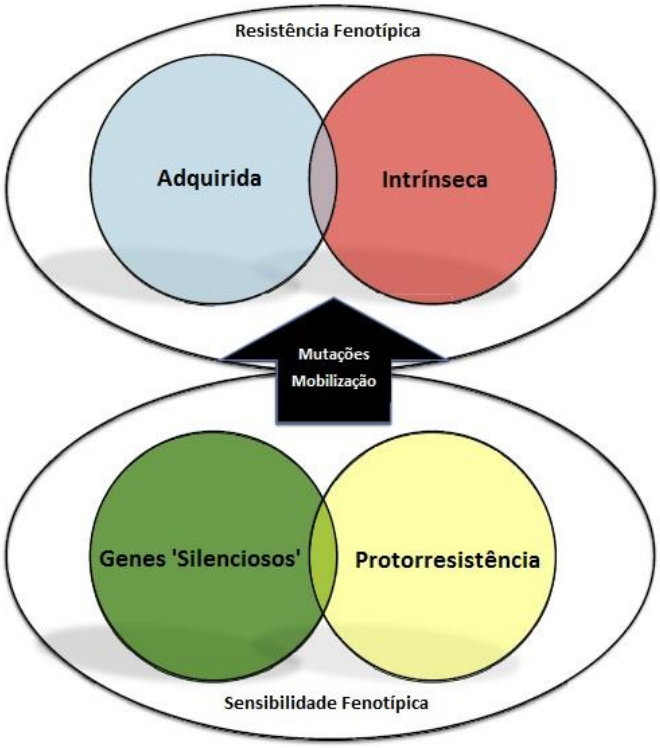


Figura 2 Nova visão do resistoma antibiótico (Adaptado de Perry *et al.*, 2014)

Esta nova visão do resistoma antibiótico admite que o ser humano e a pressão selectiva provocada, desempenham um papel fundamental na mobilização dos genes de resistêcnia, na frequência alélica e na moldagem das novas estirpes bacterianas. Como é visível na Figura 2, existem dois tipos principais de genes de resistência:

1. Os genes que transmitem o fenótipo de resistência, nos quais se incluem os genes adquiridos através de mutações desenvolvidas pelos fármacos utilizados ou através de transferência horizontal de outros microorganismos resistentes (estes genes podem estar presentes tanto em plasmídeos como em cromossomas); e a resistência intrínseca que consiste nas capacidades naturais das estirpes bacterianas para combater os antibióticos, como por exemplo a membrana celular das estirpes Gram-negativas (estes genes apenas estão presentes nos cromossomas);

2. Os genes que transmitem sensibilidade fenotípica, nos quais estão incluídos, os chamados genes 'silenciosos', que são genes que apenas são expressos na ocorrência de uma mutação ou através de transferência para uma espécie ou ambiente distinto; e os genes de protorresistência, que possuem o potencial para se tornarem genes de resistência no caso de ocorrer uma mutação ou se forem mobilizados para outra espécie ou ambiente. Esta categoria de genes não se expressa na presença de antibióticos e a sua dispersão é ainda desconhecida.

Dentro destas dois tipos de genes de resistência, o resistoma ambiental é considerado aquele que engloba todos os genes presentes em estirpes bacterianas não patogénicas e o resistoma clínico engloba todos os genes capazes de conferir um fenótipo patogénico às bactérias (Perry *et al.* 2014). Como é perceptível pela descrição feita desta nova visão do resistoma, a transferência horizontal de genes de resistência desempenha um papel muito importante na evolução e dispersão da resistência aos antibióticos. Numa referência a este facto, Perry e colaboradores fazem uma comparação interessante e curiosa: "se as mutações são o cavalo de corrida da evolução, então a transferência horizontal de genes é uma varinha mágica, capaz de instantaneamente converter genes de protorresistência e genes silenciosos" (Perry *et al.* 2014).

A importância e a ideologia por trás do conceito de resistoma é semelhante, tanto na versão antiga como na visão mais actual. A ideia de que se deve ver o resistoma como um todo é partilhada por ambas as visões, sendo assim é importante estudar o papel dos antibióticos fora dos ambientes clínicos, é importante investigar o resistoma ambiental e inquirir e compreender os mecanismos de transferência genética entre o resistoma ambiental e clínico (Forsberg *et al.* 2012; Perry *et al.* 2014; Wright 2010a).

1.4 Bactérias Indicadoras da Resistência aos Antibióticos

O número de bactérias que apresentam multirresistência a agentes antibacterianos tem vindo a aumentar exponencialmente nas últimas décadas. Para isto, o uso excessivo de antibióticos por parte do Homem não deve ser menosprezado, pois provocou a contaminação e a acumulação destes compostos em diversos ecossistemas e acelerou todo o processo evolutivo (Wellington *et al.* 2013). A emergência da resistência aos antibióticos levou várias organizações ligadas à saúde, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Centro Europeu para o Controlo e Prevenção de Doenças (ECDC) e o Centro Americano para o Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), a declararem o estado de emergência e definindo-o como um dos maiores problemas de saúde pública (Roca *et al.* 2015). Atendendo à necessidade de combater o aumento da resistência antimicrobiana, estas organizações criaram programas de vigilância e de monitorização da evolução da susceptibilidade aos antibióticos em bactérias de diferentes origens.

No desenvolvimento destes programas de vigilância, foi essencial definir estirpes indicadoras de resistência, ou seja, bactérias altamente presentes numa grande diversidade de ecossistemas e que sejam tanto patogénicas como comensais, de forma a comparar a resistência entre os vários nichos ecológicos e analisar a pressão selectiva exercida pelos antibióticos nos diversos ambientes (Torres 2012). Utilizadas durante décadas e foco de vários estudos, as bactérias *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. são duas bactérias indicadoras clássicas, consideradas microorganismos de excelência para os estudos de evolução e controlo da resistência aos antibióticos (Brooks e Field 2016; van den Bogaard e Stobberingh 2000). A capacidade extraordinária de estas bactérias em adquirir e transferir genes de resistência a outras bactérias, o facto de representarem tanto as bactérias Gram-negativas como Gram-positivas e a possível funcionalidade como reservatórios de genes de resistência, torna estas bactérias indicadores de elevado interesse (Allen *et al.* 2013; Costa *et al.* 2006).

Uma das mais importantes estirpes bacterianas relacionadas com a resistência aos antibióticos e com infecções bacterianas em medicina humana e veterinária é *Escherichia coli* produtora de beta-lactamases de espectro largo (ESBL), muito utilizada em estudos de evolução da resistência no meio ambiente e especificamente entre animais selvagens (Ben Sallem *et al.* 2014; Costa *et al.* 2008; Costa *et al.* 2006; Pinto *et al.* 2010; Poeta *et al.* 2009;

Radhouani *et al.* 2013a; Saenz *et al.* 2004; Szmolka e Nagy 2013). Sendo este o principal tema de foco desta tese, é relevante abordar com algum pormenor os mecanismos de acção desta estirpe bacteriana, e fazer uma descrição detalhada das suas características fisiológicas.

1.4.1 *Escherichia coli* como bactéria indicadora da resistência aos antibióticos

Identificada e descrita pela primeira vez em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich, *Escherichia coli* é uma enterobactéria presente na flora intestinal, quer de humanos quer de animais saudáveis. Inicialmente, esta bactéria foi denominada de *Bacterium coli commune* (bacilo comum do cólon) por este pediatra, que descobriu que este microorganismo estava presente na microflora intestinal de indivíduos saudáveis (Shulman *et al.* 2007). Este facto foi revolucionário para a época, contudo, actualmente é do conhecimento geral que tanto *E coli*, como outras bactérias comensais vivem em simbiose no tracto intestinal de seres humanos e animais. Desde a sua descoberta, *Escherichia coli* tornou-se rapidamente um organismo modelo para vários estudos bioquímicos. O seu crescimento rápido, a sua prevalência, a facilidade de cultivo e o facto de manifestar uma extensa variedade de estirpes levou Escherich e muitos investigadores contemporâneos a utilizarem este microorganismo.

Em 1906, através de Rudolf Massini, a área da genética bacteriana foi iniciada, precisamente, com a aplicação de teorias genéticas a estirpes bacterianas de *Escherichia coli* (Friedmann 2014). Desde então, estudos com esta bactéria conduziram a grandes descobertas na área enzimática, como a inibição competitiva, na área do metabolismo dos aminoácidos e na área da genética e dos mecanismos de recombinação, replicação de ADN e síntese protéica (Friedmann 2014; Gutiérrez-Ríos *et al.* 2003). Numa referência prévia a um processo que irá ser abordado com mais pormenor no seguimento deste estudo, foi também em *Escherichia coli* que se identificou, pela primeira vez, o processo de conjugação bacteriana (Tatum e Lederberg 1947).

Relativamente às características filogenéticas, esta espécie bacteriana apresenta-se como uma enterobactéria, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bacilo, não esporulado e com flagelos perítricos (Poeta *et al.* 2008). Em termos bioquímicos, caracteriza-se por ser anaeróbia facultativa, produtora de catalase e citocromo-oxidase negativa e fermentadora da glucose e lactose (Rodríguez-

Angeles 2002). Geneticamente, o genoma desta bactéria foi dos primeiros a ser totalmente sequenciado em 1997, possui um nucleóide superenrolado, com um cromossoma circular com cerca de 4700 genes, muitos deles com funções desconhecidas (Bennett 2008; Blattner *et al.* 1997).

Apesar da maioria das estirpes de *E. coli* apresentar um fenótipo comensal presente no tracto intestinal de muitos animais, existem no entanto algumas estirpes que transportam diversas resistências a factores ambientais, resistências a antibióticos e factores de virulência que as definem como estirpes patogénicas. Estas estirpes com potencial patogénico são frequentemente responsáveis por várias doenças, como processos diarreicos, infecções do tracto urinário, septicemias ou meningite neonatal (Orskov e Orskov 1992). Entre os perfis fenotípicos das estirpes de *Escherichia coli* comensais e patogénicas existem diferenças genotípicas, que podem diferir até 20%, e que, consequentemente, resultam em diferentes padrões de expressão génica (van Elsas *et al.* 2011).

Actualmente, são inúmeros os estudos que relatam estirpes de *Escherichia coli* patogénicas presentes em distintos ambientes e diversas espécies de animais, incluindo o ser humano. A capacidade invulgar desta espécie bacteriana em adquirir e transferir genes entre bactérias através da conjugação, auxíliou drasticamente a dispersão e a disseminação das estirpes patogénicas. Devido à conjugação, é possível a transferência de genes de resistência a antibióticos entre seres humanos, animais e meio ambiente. Esta característica excepcional de *Escherichia coli* conduziu a comunidade científica a um estudo mais aprofundado desta bactéria, o que levou à descoberta de inúmeras estirpes de multirresistentes nos mais variados contornos ambientais, desde seres humanos, animais selvagens e até em amostras de água e alimentos vegetais (Costa *et al.* 2008; Saenz *et al.* 2004; van Elsas *et al.* 2011).

1.4.1.1 Identificação e classificação filogenética das estirpes de *Escherichia coli*

Para realizar a identificação precisa das estirpes de *Escherichia coli* é necessário realizar uma bateria extensa de testes e provas biológicas e bioquímicas. Em primeiro lugar, é realizada a cultura das amostras em diferentes meios selectivos, por exemplo, a sementeira de *E. coli* em agar MacConkey permite identificar colónias de cor rosa, o que significa que esta bactéria fermenta a lactose. De seguida, é realizada a coloração através da técnica de Gram,

para identificar as bactérias Gram-negativas. Após este teste é feita a prova da oxidase para verificar que o isolado é oxidase negativa, tal como as estirpes de *Escherichia coli*. Por fim procede-se à bateria de provas para identificação bioquímica: galeria API 20 E utilizada para a identificação de bactérias da família *Enterobactericeae*; TSI (teste do tripo açúcar-ferro) em que *E. coli* fermenta os três açúcares utilizados e ocorre acidificação e produção de gás; e IMViC (indol, vermelho de metilo, "Vogues-Proskauer" e citrato), que consiste em quatro provas distintas, sendo as estirpes identificadas como *E. coli*, positivas para duas delas (a prova do indol e a prova do vermelho de metilo) e negativas para as outras duas (a prova de "Vogues-Proskauer" e a prova de citrato). No caso de estirpes de *Escherichia coli* altamente virulentas e contaminates, deve-se proceder à realização das provas de MacKenzie e de Eijkman (Poeta *et al.* 2008).

Relativamente à classificação filogenética das estirpes, ao longo do tempo, com a evolução da ciência, com a descoberta de novos dados sobre o genoma bacteriano e com o estudo das sequências *multilocus*, o número de grupos filogenéticos foi progredindo e aumentando, acompanhando os desenvolvimentos científicos. Assim sendo, segundo Clermont e colaboradores, em 2000, os isolados de *Escherichia coli* podiam ser classificados em quatro grupos filogenéticos distintos de acordo com a sua virulência: A, B1, B2 e D (Clermont *et al.* 2000). Passados nove anos, em 2009, Touchon e colaboradores, baseando-se em informação genómica, dividiram as estipes de *E. coli* em seis grupos filogenéticos distintos: A, B1, B2, C, D e E (Touchon *et al.* 2009). Em 2013, com a recolha de dados genómicos e dados de sequência *multilocus* de *Escherichia coli*, Clermont e colaboradores, adicionaram dois grupos filogenéticos à classificação prévia, formando um total de oito grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E, F e I (Clermont *et al.* 2013).

Apesar da existência de um vasto número de grupos filogenéticos, todos os estudos defendem que os isolados de *Escherichia coli* podem ser classificados em quatro grupos filogenéticos principais: A e B1, grupos irmãos, geralmente comensais; B2, grupo que acumula factores de virulência extraintestinais; e D, no qual se incluem os serotipos enteropatogénicos (Clermont *et al.* 2000; van Elsas *et al.* 2011). Esta classificação permite avaliar o grau de patogenicidade dos isolados em estudo e tem um papel essencial na percepção da evolução e disseminação das resistências aos antibióticos (Clermont *et al.* 2000). Resumindo, as estirpes atribuídas aos grupos A e B1 são geralmente comensais e não provocam infecções extraintestinais, enquanto as estirpes atribuídas aos grupos filogenéticos

B2 e D têm uma maior probabilidade de provocarem infecções extraintestinais e de ocorrerem em casos clínicos.

Através de uma reacção de PCR, simples e rápida, é possível determinar o grupo filogenético dos isolados de *Escherichia coli*. Esta técnica, desenvolvida por Clermont e colaboradores, baseia-se na detecção de dois genes (*chu*A e *yja*A) e um fragmento de ADN (*tsp*E4.C2) (Clermont *et al.* 2000). Inicialmente é testada a presença ou ausência do gene *chu*A. Após análise, nos isolados que possuírem este gene, é testada a presença/ausência do gene *yja*A. Os isolados que possuírem também o gene *yja*A, são atribuídos ao grupo filogenético B2 e os isolados negativos para a presença deste gene são atribuídos ao grupo D. No caso dos isolados negativos para o gene *chu*A, posteriormente, é analisada a presença ou ausência do fragmento de ADN *tsp*E4.C2. Os isolados positivos para a presença deste fragmento são atribuídos ao grupo filogenético B1 e os isolados negativos são atribuídos ao grupo A (Clermont *et al.* 2000). Está análise torna-se mais clara, acessível e fácil de compreender, através da chave dicotómica observável na Figura 3.

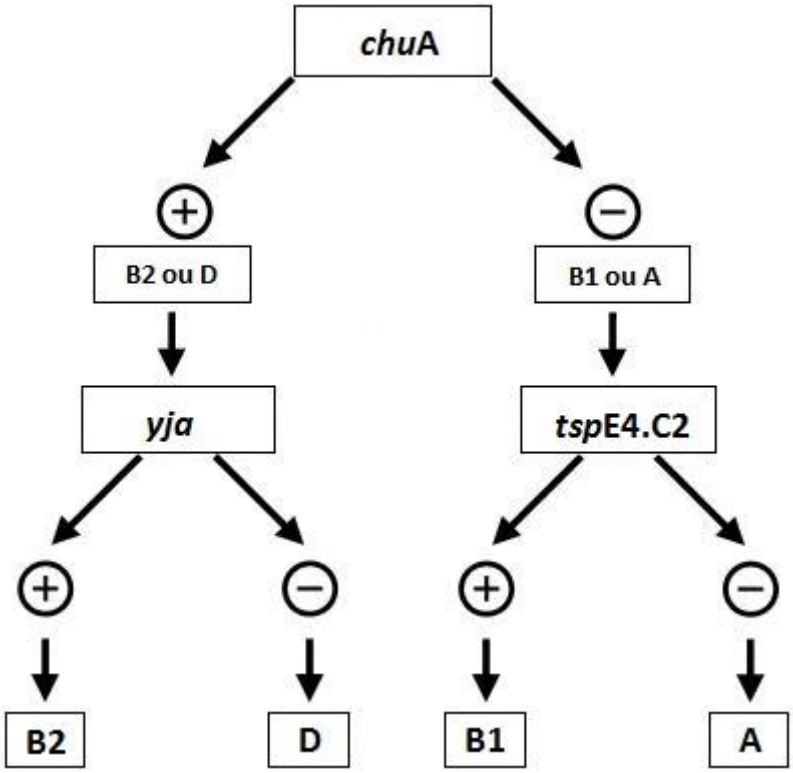


Figura 3 Chave dicotómica para a classificação dos grupos filogenéticos em *Escherichia coli*, através da reacção de PCR (Adaptado de Clermont *et al.*, 2000)

Apesar de existirem técnicas distintas às quais é possível recorrer, esta técnica desenvolvida por Clermont e colaboradores é mais simples e rápida, podendo ser realizada uma PCR-triplex ou três reacções distintas de PCR. Para analisar os grupos filogenéticos das estirpes de *Escherichia coli* é possível recorrer a técnicas mais complexas e morosas como a electroforese enzimática *multilocus* ou a detecção de polimorfismos no comprimento dos fragmentos de restrição (Bingen *et al.* 1998; Herzer *et al.* 1990).

1.4.1.2 Resistência aos antibióticos em *Escherichia coli* produtora de β-lactamases de largo espectro

As β-lactamases de largo espectro (ESBL) são enzimas que se caracterizam por utilizarem a serina presente no seu centro activo para romper o anel β-lactâmico presente nos antibióticos deste tipo, inactivando desta forma o fármaco. Estas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de largo espectro de primeira, segunda, terceira e quarta grações e o aztreonam, que são antibióticos importantes na área clínica, contudo não conferem resistência a cefamicinas e carbapenemases (Livermore 1995; Paterson e Bonomo 2005). Contudo, actualmente já são detectáveis estirpes bacterianas resistentes tanto a antibióticos beta-lactâmicos como carbapenemases (Johnson *et al.* 2017).

A produção de β-lactamases é um dos mecanismos de resistência mais antigos e mais comuns em bactérias Gram-negativas, como as enterobactérias da espécie *Escherichia coli*. Este fenómeno natural foi observado em estirpes de *E. coli* antes da introdução do primeiro antibiótico beta-lactâmico, a penicilina, na prática clínica (Abraham e Chain 1988). A introdução das cefalosporinas de terceira geração na prática clínica na década de 1980, apesar de ter sido considerado um avanço importante nessa época, visto que começavam a emergir várias espécies bacterianas como *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases, provocou a evolução e diversificação exponencial destas enzimas e ampliou massivamente o seu espectro de actividade (Paterson e Bonomo 2005). Após este primeiro contacto com antibióticos beta-lactâmicos, seguiu-se o desenvolvimento de variados antibióticos resistentes à hidrólise por parte das β-lactamases e a resposta bacteriana foi sempre semelhante, surgindo sempre novas enzimas promotoras de resistência a estes fármacos (Bradford e Dean 2008). Facto que sugere que o aparecimento de novas variantes de

β-lactamases, ocorreu devido à pressão selectiva provocada pelo uso abusivo de novos antibióticos na práctica clínica (Bradford 2001).

Outra propriedade extremamente importante destas enzimas, e repetidamente observada e aplicada neste estudo, é que as β-lactamases são frequentemente codificadas por plasmídeos (Carattoli 2009). Essas moléculas móveis de ADN transportam geralmente genes que codificam resistências a outros antibióticos juntamente com os genes responsáveis pela produção de β-lactamases. Desta forma, para além de se disseminarem facilmente e de formarem bactérias multirresistentes, reduzem drasticamente as opções de tratamento de estirpes bacterianas produtoras de ESBL (Paterson e Bonomo 2005).

A primeira β-lactamase a ser observada em espécies bacterianas Gram-negativas foi do tipo TEM-1 (juntamente com TEM-2 e SHV-1), em 1960, na Grécia, e foi isolada de uma estirpe de *Escherichia coli* de uma paciente chamada Temoniera, que consequentemente baptizou a β-lactamase (Datta e Kontomichalou 1965; Medeiros 1984). A partir destas β-lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1) inicialmente descobertas e através da acumulação de pequenas mutações aminoacídicas, surgiram as denominadas β-lactamases de largo espectro ou ESBLs (Bush e Jacoby 2010). Nas últimas décadas, assistiu-se a um crescimento exponencial e preocupante das estirpes de *Escherichia coli* produtoras deste tipo de enzimas de largo espectro, ao ponto de serem observáveis e isoladas tanto em ambientes clínicos como em ambientes naturais (Canton *et al.* 2008; Costa *et al.* 2006).

Actualmente existem numerosos tipos de ESBL distintos, sendo as famílias mais comuns: TEM, SHV, CTX-M e OXA. Todas elas presentes em distintas espécies de enterobactérias, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus* spp. e *Providencia* spp., sendo que neste estudo em particular o foco está nas estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL (Bradford 2001).

Numa abordagem mais aprofundada de cada família de ESBL, é possível observar algumas divergências e bastante diversidade, nas espécies em que estão presentes, nos locais mais comuns de observação e na sua virulência e capacidade de dispersão. As β-lactamases do tipo TEM, as primeiras a serem relatadas, contam actualmente com uma lista de mais de uma centena de enzimas descritas com pequenas variações aminoacídicas entre elas (ver lista em www.lahey.org/studies/). A primeira ESBL do tipo TEM acredita-se ter sido detectada em Inglaterra no ano de 1982, num isolado de *Klebsiella oxytoca* resistente à ceftazidima, e

actualmente é denominada de TEM-12 (Du Bois *et al.* 1995).A segunda ESBL deste tipo foi detectada em França em 1984 e foi inicialmente denominada de CTX-1 devido à sua actividade contra a cefotaxima, contudo, mais tarde a sua denominação foi alterada para TEM-3, visto diferir da enzima TEM-2 por apenas dois aminoácidos (Sirot *et al.* 1987; Sougakoff *et al.* 1988). Entre as β-lactamases de largo espectro mais detectadas actualmente estão as seguintes: TEM-3, -10, -26, -52 e -116 (Livermore 2012). É de destacar que a localização dos genes codificadores de β-lactamases em plasmídeos permite que sejam observadas estirpes de *Escherichia coli*, e de outras enterobactérias, produtoras desta enzima nos mais variados ambientes (Ben Sallem *et al.* 2012; Rodrigues *et al.* 2013). No âmbito deste estudo é ainda de sublinhar a observação frequente de β-lactamases do tipo TEM-52 e do tipo TEM-20 em animais selvagens, algo que pode ser conferido através da Figura 4 (Marinho *et al.* 2016). Do ponto de vista clínico, em Portugal, as estirpes do tipo TEM-24 são frequentemente observadas (Machado *et al.* 2007).

As ESBLs do tipo SHV, tal como as do tipo TEM, foram as primeiras a serem descobertas. A primeira β-lactamase de largo espectro do tipo SHV foi identificada em 1983, na Alemanha, num isolado de *Klebsiella ozaenae* que era capaz de hidrolisar cefotaxima e ceftazidima (Knothe *et al.* 1983). Esta enzima, denominada de SHV-2, diferia da primeira β-lactamase do tipo SHV em apenas um aminoácido (glicina por serina), e esta pequena alteração era o que lhe permitia ser considerada uma ESBL (Paterson e Bonomo 2005). Tal como as β-lactamases do tipo TEM, rapidamente esta enzima se dispersou pelo mundo e, em aproximadamente 15 anos, já tinha sido detectada em microorganismos em todos os continentes (Paterson *et al.* 2003). Contudo, ao contrário das β-lactamases do tipo TEM, o número de enzimas distintas do tipo SHV é bastante mais reduzido. A maioria de ESBLs do tipo SHV são isoladas em ambiente clínico e em *Klebsiella pneumoniae*, contudo, são também isoladas de estirpes de *E. coli* (Jacoby 1997). As variantes de β-lactamases do tipo SHV mais comummente observadas são do tipo SHV-2, -5, -11 e -12 (Livermore 2012). Entre estas β-lactamases do tipo SHV, e no enquadramento deste estudo, são de destacar a SHV-5 e SHV-12, frequentemente observadas em animais de consumo e animais selvagens, como as douradas e as aves de rapina (Figura 4) (Pinto *et al.* 2010; Sousa *et al.* 2011). Em Portugal a β-lactamase do tipo SHV-12 foi ainda observada em amostras aquáticas associadas a outros genes de resistência presentes em plasmídeos (Alves *et al.* 2014).

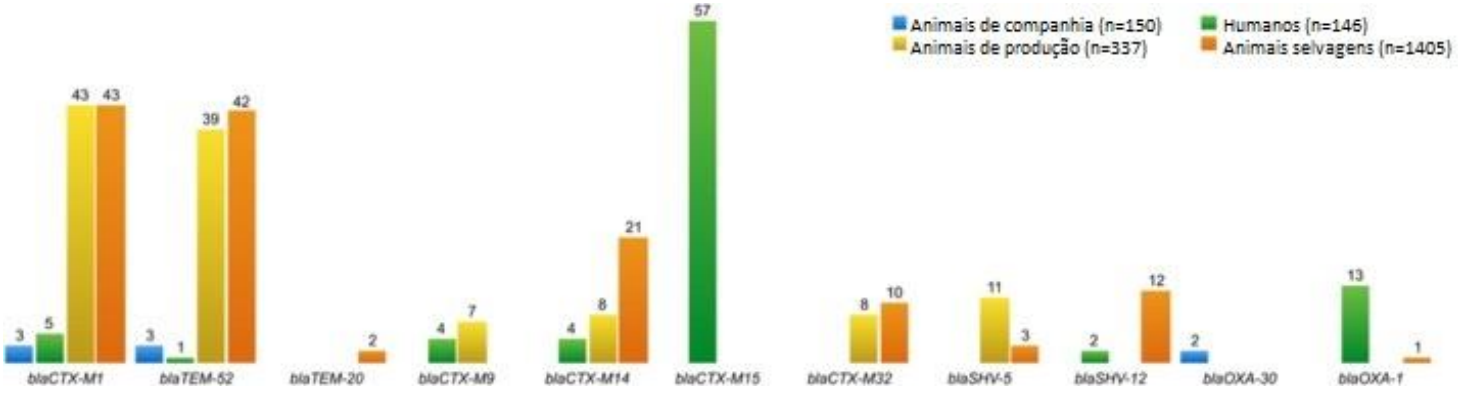


Figura 4 Número de isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL divididos por gene codificador de β-lactamases, num total de 403 isolados (Adaptado de Marinho *et al*., 2016)

Em relação às β-lactamases do tipo CTX-M, muitos estudos já foram realizados sobre este tipo de enzima. O nome deste tipo de β-lactamases deriva da sua potente capacidade de hidrolisar cefotaxima. Tal como as ESBLs identificadas anteriormente, os genes codificadores de β-lactamases do tipo CTX-M são frequentemente transportados por plasmídeos multirresistentes (Carattoli 2009; Livermore *et al.* 2007). Este tipo de enzimas foi pela primeira vez identificado no Japão em 1986, em cães de laboratório usualmente administrados com antibióticos beta-lactâmicos, e foi observado através de um estudo de conjugação (Matsumoto *et al.* 1988). Estudos demonstraram que os genes codificadores da β-lactamase CTX-M tiveram a sua origem em genes cromossómicos da bactéria do solo *Kluvyera* spp. (Pitout 2010). Desde a sua descoberta, a dispersão e prevalência deste tipo de β-lactamases tem vindo a crescer exponencialmente, sendo actualmente o tipo de enzima mais observada e ultrapassando sobremaneira as primeiras enzimas descobertas, TEM e SHV. Actualmente, as estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases do tipo CTX-M são mais comuns em infecções comunitárias, ao contrário das outras β-lactamases (TEM e SHV), mais presentes em infecções nosocomiais (Pitout 2010). Contudo, as estirpes de *E. coli* produtoras de β-lactamases CTX-M são frequentemente observadas em associação com genes de resistência a outras classes de antibióticos como as fluoroquinolonas, com especial destaque para as estipres produtoras de CTX-M-15 (Canton e Coque 2006). Juntamente com esta β-lactamase CTX-M-15, as mais frequentes são: CTX-M-1, -9, -14, -32. Em Portugal, como é visível nas Figura 4 e 5 destacam-se os tipos CTX-M-1 e -32, mais presentes em animais selvagens e animais de produção e consumo; CTX-M-9 e -14, observadas tanto em animais como em seres humanos; e CTX-M-15, frequentemente observadas em isolados de humanos (Marinho *et al.* 2016). Todos estes tipos de enzima estão actualmente muito bem dispersos pelas

bactérias produtoras de β-lactamases, por toda a Europa e pelo mundo. Todos os estudos destacam o tipo CTX-M-15 pela sua dispersão, sublinhada na Figura 5, pela sua associação com outros genes beta-lactâmicos (TEM-1 e OXA-1) e outros genes de resistência (Canton *et al.* 2008; Pitout 2010).

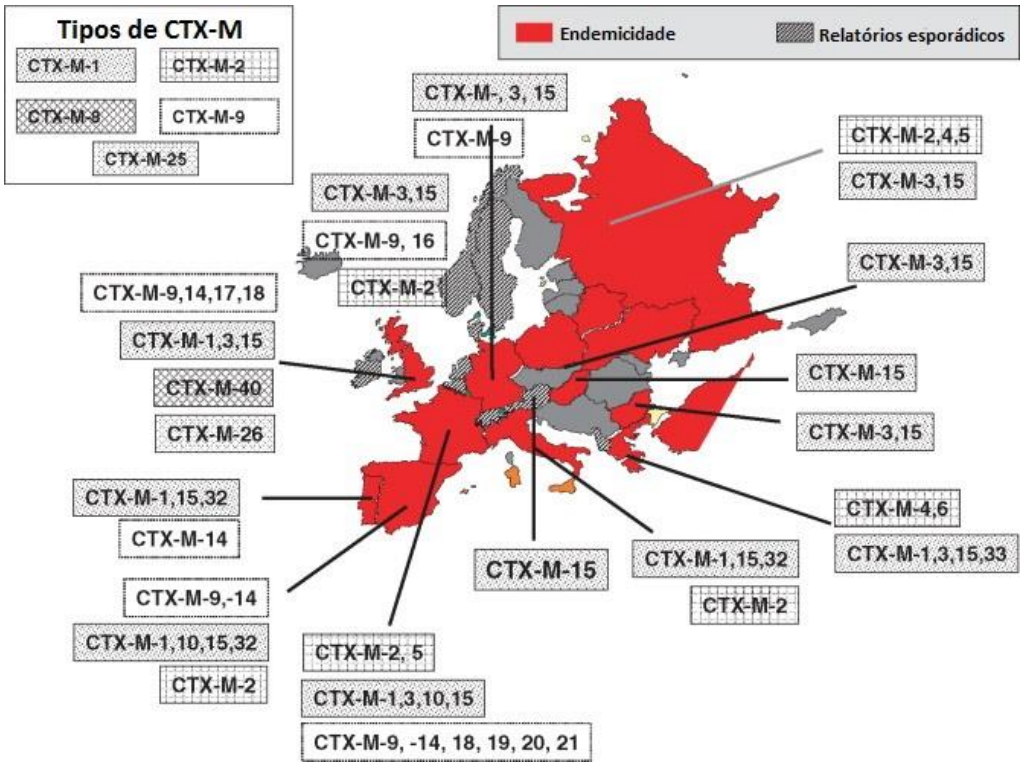


Figura 5 Distribuição das β-lactamases de largo espectro do tipo CTX-M pela Europa (Adaptado de Canton *et al.*, 2008)

Por fim, relativamente às β-lactamases do tipo OXA, o seu nome deriva da capacidade deste tipo de enzimas de hidrolisar a oxacilina. Foi originalmente detectada na Turquia e numa estirpe de *Pseudomonas aeruginosa*, e é nesta espécie bacteriana que é encontrada mais frequentemente, contudo, é muitas vezes observada também em estirpes de *Escherichia coli* (Paterson e Bonomo 2005). As estirpes bacterianas produtoras de β-lactamases do tipo OXA são geralmente resistentes à ampicilina e à oxacilina, como previamente referido, mas apresentam uma taxa de inibição baixa relativamente ao ácido clavulânico (Jacoby 1997). Tal como as β-lactamases do tipo CTX-M, estas enzimas foram identificadas tardiamente, mas têm vindo a ser observadas com maior regularidade, principalmente e curiosamente em isolados bacterianos originários da França e Turquia (Bradford 2001). Em Portugal, como é visível pela Figura 4, as β-lactamases do tipo OXA mais frequentes são: OXA-1, geralmente

observada em isolados bacterianos de amostras de humanos e OXA-30, observada na sua maioria em isolados de animais de companhia (Marinho *et al.* 2016).

Recentemente, numa lista das espécies bacterianas mais preocupantes e prioritárias relativamente ao desenvolvimento de novos antibióticos, os membros da família *Enterobactericeae* produtores de ESBLs foram colocados em terceiro lugar, com um nível de prioridade crítico (WHO 2017). Neste grupo estão incluídas as estirpes bacterianas alvo desta dissertação, as de *Escherichia coli* produtoras de ESBL. Este estudo é importante para determinar o grau de patogenicidade, a sua evolução no tempo e nos diversos espaços geográficos, avaliar a emergência das estirpes potencialmente patogénicas e determinar e definir estratégias futuras. Como foi previamente exposto, algo preocupante nas estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro é a sua capacidade de transferirem ADN entre espécies bacterianas homólogas. A presença destes genes codificadores destas enzimas em plasmídeos, confere a esta espécie bacteriana uma elevada capacidade de disseminação. Outro facto preocupante é que estes elementos móveis de ADN, para além dos genes codificadores de β-lactamases, transportam também outros genes de resistência bacteriana. Assim sendo, a conjugação bacteriana representa nesta espécie um mecanismo extremamente importante (Shoemaker *et al.* 2001). Sendo assim, a flora intestinal, tanto de humanos como de animais, constitui uma importante representação dos genes de resistência existentes, e a prova disso é a identificação de inúmeras estirpes bacterianas de *Escherichia coli* produtoras de ESBL em humanos, animais e amostras ambientais e de alimentos (Alonso *et al.* 2016b; Ben Sallem *et al.* 2012; Costa *et al.* 2006).

1.5 Genética Aplicada à Resistência aos Antibióticos

As bactérias são organismos unicelulares, geralmente com um genoma constituído apenas por um cromossoma circular com vários milhões de pares de base. O estudo do genoma bacteriana através das técnicas mais recentes de sequenciação permitiu caracterizar os genes associados à resistência a antibióticos, o que consequentemente permitiu compreender a dispersão de bactérias multirresistentes e auxiliou na descoberta da grande diversidade de genes de resistência a antibióticos observados actualmente (Allen *et al.* 2010; Davison 1999). Um interessante exemplo do estudo do genoma bacteriano é a análise e comparação do

genoma das estirpes de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. Quando foram comparados os dados moleculares de ambas as bactérias, foi sugerido que as linhagens filogenéticas de ambas as espécies separaram-se há cerca de 100 milhões de anos, e que desde esse acontecimento até actualmente, através de transferência horizontal, as duas espécies evoluíram para sistemas genéticos novos e bastante distintos (Davison 1999). Suportando esta teoria de que a transferência horizontal de genes tem um forte impacto nas espécies bacterianas, estimou-se ainda que aproximadamente 18% do genoma de *Escherichia coli* consiste em genes adquiridos que permitiram a esta espécie bacteriana explorar novos ecossistemas (Lawrence e Ochman 1998).

A existência de genes de resistência específicos em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões e integrões) permite que a resistência aos antibióticos se disperse dentro da mesma ou distintas espécies (Bennett 2008; Carattoli 2001). Outro facto importante para a dispersão dos genes de resistência são os mecanismos de transferência de material genético. Foram identificados três mecanismos distintos de transferência de genes em bactérias, denominados mecanismos de transferência horizontal: a conjugação, a transformação e a transdução. O estudo destes métodos de transferência de ADN promoveu a compreensão da genética bacteriana e permitiu o desenvolvimento da biotecnologia e da engenharia genética (Davison 1999). Desta forma, devido ao papel importante da transferência horizontal de genes na disseminação da resistência aos antibióticos, é importante relatar, com alguma minúcia, os três mecanismos existentes:

1. Conjugação: é o mecanismo mais frequente de transferência horizontal. Este processo consiste na transferência directa de ADN de uma bactéria para outra. Durante o mecanismo, os genes de resistência presentes em plasmídeos ou transposões conjugativos são transferidos de uma célula dadora para uma célula receptora através de contacto directo (Davison 1999). Assim sendo, neste mecanismo é essencial que as bactérias entrem em contacto uma com a outra para que se forme uma ponte citoplasmática entre elas. Uma consequência da conjugação é a ocorrência de *crossing over* entre as sequências homólogas no ADN transferido e o ADN da célula receptora (Pierce 2002). É ainda importante referir que esta troca de material genético é unidireccional, ou seja, só funciona da célula dadora para a receptora. Este mecanismo é esquematicamente visível na Figura 6.

2. Transformação: é um mecanismo que consiste na incorporação de ADN livre presente no meio circundante numa bactéria. A captação dos genes de resistência por parte da

célula receptora implica que exista ADN livre no meio, o que ocorre geralmente devido a lise celular, como é observável pelo esquema apresentado na Figura 6 (Davison 1999). Tal como na conjugação, após a transformação ocorre recombinação entre os genes introduzidos e o cromossoma bacteriano da célula receptora (Pierce 2002).

3. Transdução: é um mecanismo que implica o transporte do ADN bacteriano de uma célula para outra através de um vírus bacteriano, denominado de fago ou bacteriófago, como é visível na Figura 6 (Pierce 2002). Este processo é mais limitado e está restringido a alguns clones bacterianos (Davison 1999).

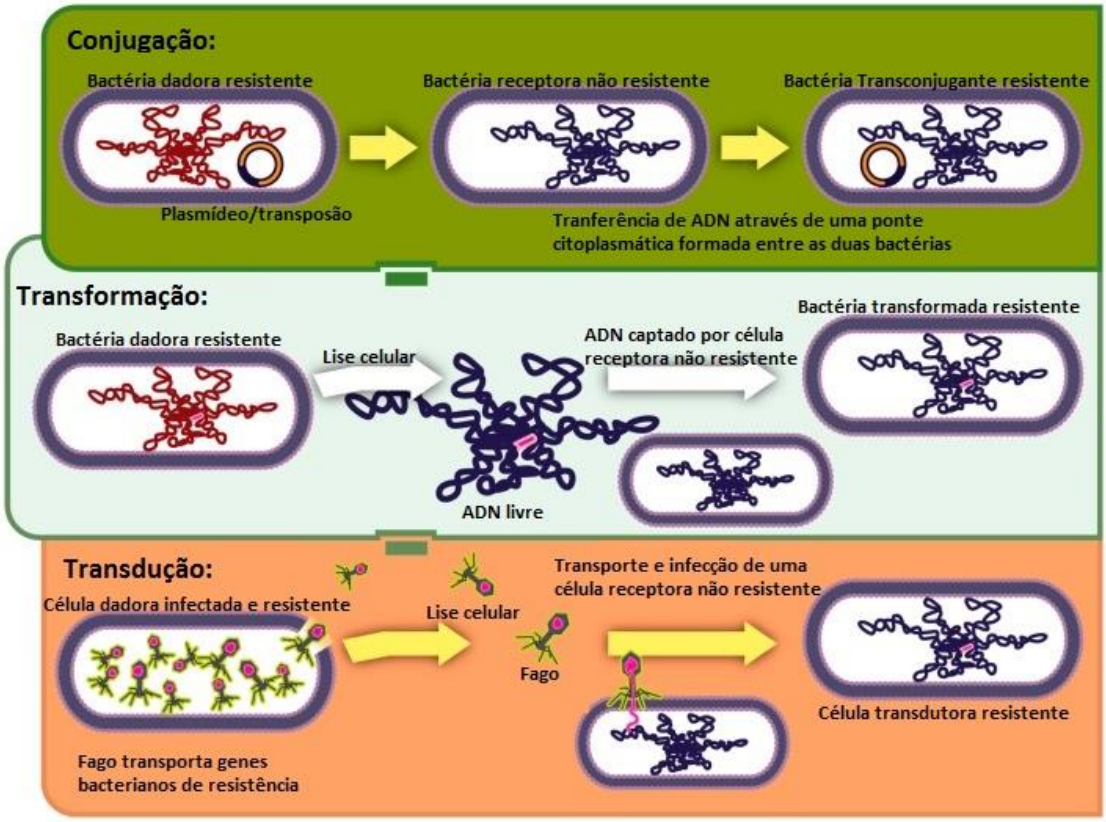


Figura 6 Mecanismos de transferência horizontal de genes em bactérias (Adaptado de Schroeder *et al*., 2017)

No contexto deste estudo é necessário realçar um dos mecanismos, que é a conjugação, processo mais frequentemente observado em estirpes bacterianas. E é importante relacionar este mecanismo com a frequente e elevada taxa de transferência de genes de resistência. Através de plasmídeos R (resistentes), pequenas moléculas de ADN circular que transportam genes de resistência, a dispersão da resistência a vários antibióticos em simultâneo, pode ocorrer através de conjugação. A identificação dos plasmídeos R é algo que

já tem alguns anos e o seu processo evolutivo ainda possui mais anos, visto que se iniciou com a utilização expansiva dos antibióticos (Frost 1992; Pierce 2002). O termo'plasmídeo' foi sugerido por Joshua Lederberg em 1952, o mesmo cientista que descreveu, juntamente com Edward Tatum, o processo de conjugação bacteriana (Norman *et al.* 2009). Contudo, o estudo destas moléculas de ADN desenvolveu-se bastante após a emergência repentina da resistência aos antibióticos, prova disso é um estudo relativamente antigo que procurou simular a transferência de plasmídeos de resistência em microambientes naturais simulados (Kruse e Sørum 1994; Norman *et al.* 2009). Este estudo conseguiu demonstrar que a conjugação pode ocorrer entre estirpes bacterianas de diferentes nichos ecológicos (humano, animal e ambiental). Desta forma, é importante destacar o papel importante da conjugação bacteriana e dos plasmídeos R na dispersão dos genes de resistência. Contudo, existem mais elementos móveis que permitem a transferência de material genético entre células bacterianas. Na secção seguinte estes elementos móveis são descritos com mais pormenor.

1.5.1 Elementos genéticos de aquisição e transferência de genes

Existem três elementos móveis principais envolvidos na aquisição de genes, e estes três elementos podem ser divididos em dois grupos gerais distintos: elementos capazes de se moverem entre células bacterianas, como os plasmídeos R, previamente referidos, e os transposões de resistência conjugativos; e os elementos que apenas se movem entre localizações genéticas distintas dentro da mesma célula bacteriana, como por exemplo os integrões e as cassetes de genes (Bennett 2008). Enquanto os elementos constituintes do primeiro grupo implicam que ocorra replicação nas células transconjugantes ou transformantes, os elementos do segundo grupo requerem recombinação e/ou replicação (Bennett 2008).

De forma breve e resumida, os elementos móveis, como os plasmídeos e transposões, são importantes distribuidores de genes de resistência entre géneros e espécies diferentes de bactérias, sem qualquer tipo de distinção relativamente às barreiras intergenéricas entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Arends *et al.* 2012; Trieu-Cuot *et al.* 1987). Fernando de la Cruz chega até a afirmar, no seu estudo sobre a transferência horizontal de genes, que esta distinção é "certamente um produto da imaginação humana que tem sido

ignorada por microorganismos durante biliões de anos" (de la Cruz e Davies 2000). Seguidamente, os três elementos móveis principais são descritos com mais pormenor.

1.5.1.1 Plasmídeos

Muito frequentemente, as bactérias, para além do seu cromossoma, possuem também plasmídeos. Estas moléculas de ADN circular de cadeia dupla são capazes de se autorreplicar e contém entre 2/3 genes até cerca de 400 ou mais genes (Charlebois 1999).Os plasmídeos possuem genes que não são essenciais para o crescimento celular, mas transportam genes necessários para que a célula sobreviva em condições ambientais particulares, como por exemplo na presença de um antibiótico ou de metais pesados tóxicos (Bennett 2008).

A maioria dos plasmídeos observados em estirpes bacterianas é transferível através de conjugação e, portanto, são denominados de plasmídeos conjugativos. Existem, no entanto, outros incapazes de se autotransferir e portanto são auxiliados por plasmídeos conjugativos existentes na mesma célula, sendo assim denominados de plasmídeos não conjugativos móveis (Bennett 2008). Estes elementos móveis transportam, no seu interior, genes de resistência a antibióticos (Figura 7), genes de replicação, de metabolismos, de fertilidade e uma origem de replicação (Pierce 2002). É possível ainda dividir os plasmídeos em pequenas porções de ADN que se replicam e formam uma sequência semelhante, às quais chamamos replicões, que contêm sempre uma origem de replicação (Kollek *et al.* 1978).

A classificação dos plasmídeos é realizada segundo os seus grupos de incompatibilidade (Inc), que definem a incapacidade de os plasmídeos se propagarem com estabilidade dentro da mesma linha celular (Novick 1987). Esta incompatibilidade varia com os controlos de replicação, sendo os plasmídeos com os mesmos controlos de replicação, incompatíveis, e os plasmídeos com um sistema de replicação distinto, compatíveis (Nordstrom 2006). Para realizar esta classificação, em 2005, Alessandra Carattoli e colaboradores desenvolveram uma PCR baseada nestes grupos de incompatibilidade. Assim sendo, para a caracterização plasmídica foram desenvolvidos 18 pares de primers divididos por cinco PCRs multiplex e três PCRs simples: HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIs, B/O, K e FrepB (Carattoli *et al.* 2005). Esta técnica, denominada de "*PCR-based replicon typing*" (PBRT), irá ser abordada com mais pormenor ao longo deste estudo.

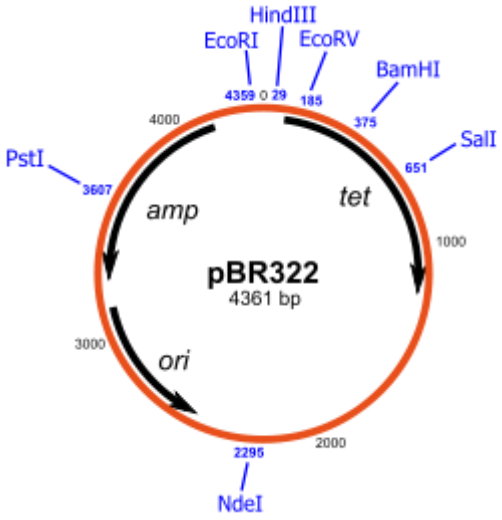


Figura 7 Composição do plasmídeo pBR322, um dos primeiros a ser utilizado para realizar processos de clonagem, que transporta genes para resistência à ampicilina (*amp*) e tetraciclina (*tet*). As setas nos genes indicam o sentido de transcrição (Adaptado de Berg *et al.*, 2002)

1.5.1.2 Transposões e sequências de inserção

Os transposões e as sequências de inserção são fragmentos de ADN linear capazes de translocar de um local para outro dentro da mesma molécula de ADN ou de uma molécula de ADN para outra distinta, como por exemplo de um plasmídeo para outro (Bennett 2008). Possuem algumas características distintas dos plasmídeos, como o facto de não possuírem a capacidade de autorreplicação, o facto de não necessitarem de uma sequência de ADN homóloga e o facto de produzirem delecções ou perda de bases aquando da sua translocação (Bennett 2008).

As sequências de inserção e os transposões possuem uma diferença muito importante, que consiste no facto do segundo codificar e transportar um gene que altera o fenótipo da célula, como por exemplo um gene de resistência aos antibióticos (Bennett 2008). As sequências de inserção possuem entre 700 e 1500 bp, já os transposões possuem entre 2 a 50 Kbp.

As sequências de inserção (IS) são constituídas por un gene de transposase central flanqueado por sequências nucleotídicas repetidas invertidas e por sequências de repetições directas (Figura 8). A transposase, codificada pela sequência de ADN central, é uma enzima responsável pela transposição, que promove a transferência de genes de resistência aos

antibióticos. Estes elementos móveis podem ser utilizados para inactivar a expressão de alguns genes através da sua inserção e interrupção das sequências codificantes (Bennett 2008).

Os transposões são constituídos por uma região central com dois genes no mínimo (o da transposase e um gene codificador de resistência a um antibiótico), flanqueados por elementos de inserção (Figura 8).

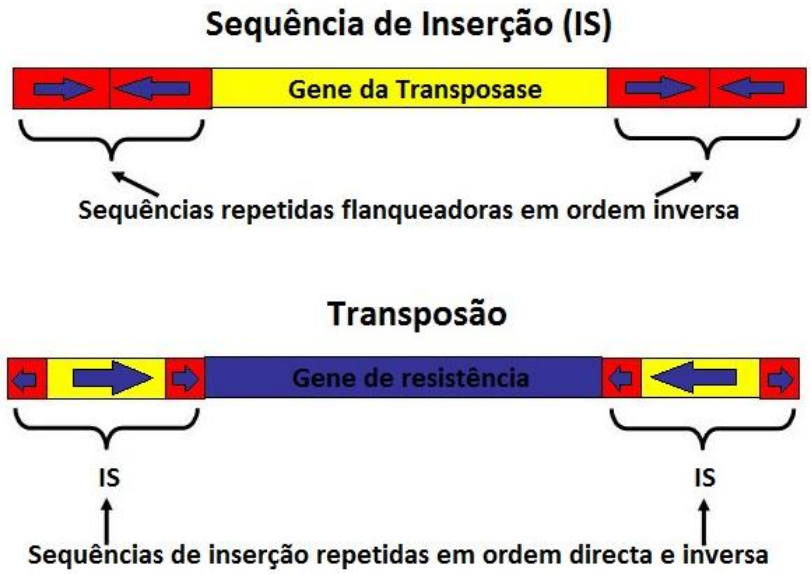


Figura 8 Estruturas esquematizadas das sequências de inserção (IS) e dos transposões

A emergência da disseminação da resistência aos antibióticos em bactérias, chamou a atenção da comunidade científica para todos os mecanismos de transferência de genes e para todos os elementos móveis existentes. O estudo dos transposões e das sequências de inserção não foi excepção e nos últimos anos foi criada uma base de dados para sequências de inserção (Siguier *et al.* 2006). Nesta base de dados, cada sequência de inserção nova inserida é associada a uma origem, a uma distribuição, uma bibliografia e no fim são agrupadas por famílias filogenéticas. O desenvolvimento e organização deste tipo de base de dados demonstram o interesse e a importância do entendimento e compreensão dos mecanismos de disseminação da resistência aos antibióticos em bactérias.

Para demonstrar a importância dos transposões no contexto deste estudo, é relevante referir que é frequente a observação de vários transposões num mesmo plasmídeo, podendo assim ocorrer o transporte e a transferência de vários genes de resistência (Madigan *et al.*

1997). Ainda relativamente ao estudo aqui desenvolvido, na Figura 9 é possível observar um transposão complexo denominado Tn*3*, que é frequentemente encontrado em plasmídeos em estirpes de enterobactérias e que codifica a resistência a antibióticos beta-lactâmicos (Bennett 2008).

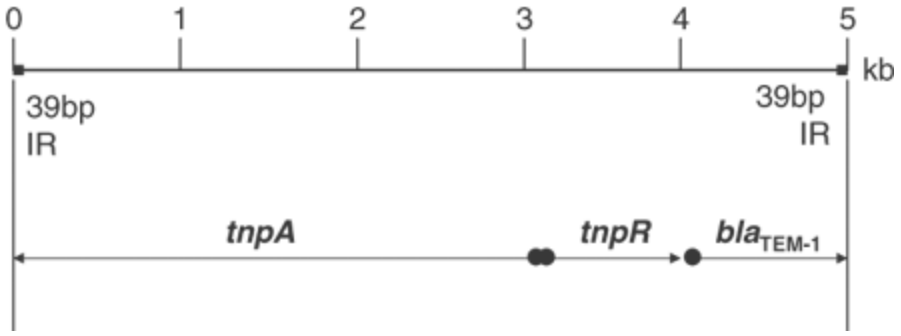


Figura 9 Diagrama do transposão complexo resistente Tn*3* que confere resistência à ampicilina e a outros antibióticos beta-lactâmicos. Contém o gene da transposase (*tnp*A), um gene codificante de uma recombinase (*tnp*R) e um gene codificador da β-lactamase do tipo TEM-1 (bla_{TEM-1}). As setas representam a direcção da transcrição (Adaptado de Bennett, 2008)

Este transposão é um exemplo de transposição replicativa, uma das duas formas de transposição, que permite que o transposão permaneça no seu lugar de origem e ao mesmo tempo se incorpore noutro lugar receptor, o que aumenta imenso o número de cópias deste transposão no interior de uma determinada célula. A outra forma de transposição é a conservativa, em que o transposão sai de um determinado local do genoma e se incorpora num novo local, deixando um vazio na localização original (Bennett 2004).

1.5.1.3 Integrões e cassetes génicas

Os integrões bacterianos são considerados sistemas de captura de genes que utilizam mecanismos de recombinação para integrar e expressar genes de resistência aos antibióticos (Bennett 2008). Estes elementos genéticos funcionam geralmente em conjunto: as cassetes de genes transportam pequenas sequências de ADN de um integrão para outro ou dentro do mesmo integrão de um local para outro. Os integrões são constituídos por três componentes essenciais (Figura 10): o gene que codifica a enzima integrasse (*intI*), um local de recombinação específico (*attI*) e promotores de expressão (P_1, P_2 P_{int}) (Carattoli 2001).

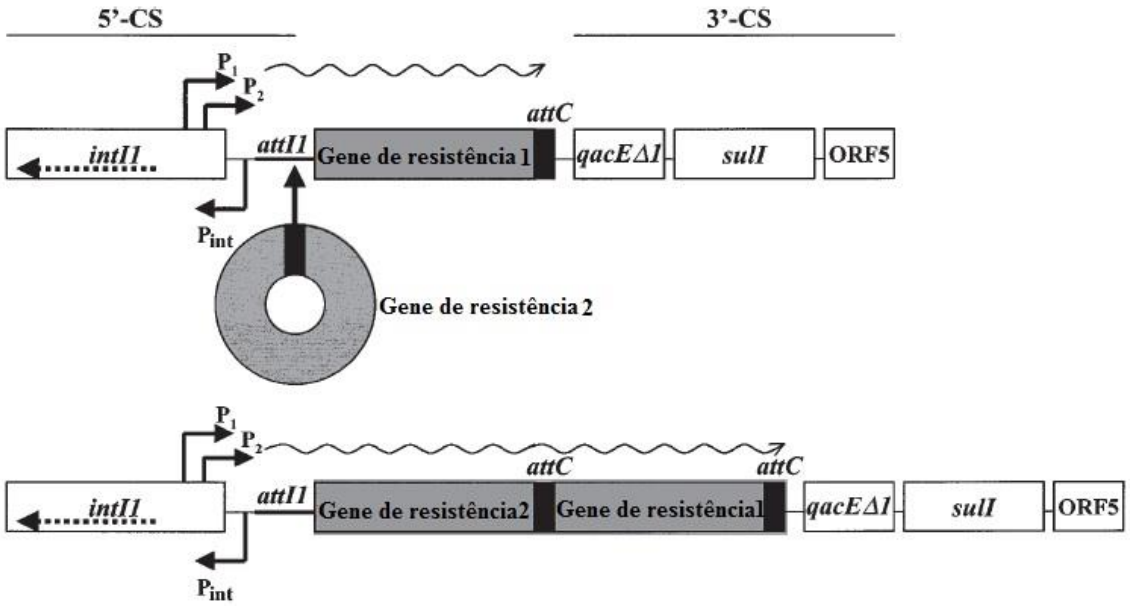


Figura 10 Estrutura esquematizada de um integrão classe 1 e da aquisição de uma cassete génica. Local de recombinação (*attI1*); Promotores do integrão (P_1 e P_2); Promotor do gene da integrasse (P_{int}); genes que conferem resistência a desinfectantes e antibióticos (*qacEΔ1* e *sul1*) (Adaptado de Carattoli, 2001)

Na Figura 10 é possível observar, de forma esquematizada, a captura de uma cassete génica por parte de um integrão. A enzima integrase reconhece a sequência de recombinação específica (*attC*) da cassete génica, e através do local de recombinação (*attI1*) do integrão receptor, permite a excisão e integração do gene de resistência da cassete génica.

De acordo com a sequência nucleotídica do gene *intI* foram definidas várias classes de integrões, contudo, só algumas dessas classes possuem cassetes génicas codificadores de resistência aos antibióticos. As classes mais comuns em bactérias resistentes aos antibióticos são as classes 1 e 2 (Carattoli 2001; Saenz *et al.* 2004).

Desta forma, os integrões podem ser definidos como um dos principais meios de transporte de genes de resistência. A sua capacidade de capturar genes, associada à sua presença noutros elementos móveis, como os plasmídeos, formam um conjunto perigoso de características. Actualmente existe uma grande variedade de genes de resistência associados a cassetes génicas, tornando de elevada importância o estudo destes elementos móveis na área da resistência bacteriana (Carattoli 2001).

Relativamente à produção de antibióticos, a todos estes mecanismos de transferência de genes e a todos os elementos móveis, Peter Bennett, no seu estudo focado em plasmídeos, faz uma comparação interessante: "é a diferença entre um *hacker* e um computador à procura de uma *password*; enquanto o primeiro se apoia na inteligência e discernimento, o segundo utiliza a sua capacidade de realizar todas as combinações possíveis" (Bennett 2008). O que significa que é uma 'luta' desigual entre o Homem e as bactérias, e o mais desconcertante é que durante anos, com a utilização abusiva dos antibióticos, o Homem esteve a auxiliar e a promover o crescimento do 'inimigo'.

1.6 Presente e Futuro da Resistência aos Antibióticos

Considerado pela Organização Mundial de Saúde um dos mais importantes problemas de saúde pública, a resistência aos antibióticos é hoje uma temática que concentra a atenção da comunidade científica (Roca *et al.* 2015). A rápida dispersão e adaptação a novos meios das bactérias multirresistentes, levou ao aparecimento de estirpes patogénicas em meios hospitalares, criando infecções nosocomiais frequentes, como o caso de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) ou as estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro (ESBL) (Carballo *et al.* 2017; Correia *et al.* 2012).

Esta problemática levou a Organização Mundial de Saúde a lançar, no ano de 2017, uma lista das bactérias patogénicas prioritárias relativamente à investigação, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (Tabela 2). Este documento realça ainda que as listas prévias, desenvolvidas pelas empresas farmacêuticas, eram feitas de acordo com critérios como a pressão dos investidores, o tamanho do mercado de procura ou o potencial da descoberta científica (WHO 2017). Esta lista foi dividida por graus de prioridade, com as três primeiras bactérias definidas com prioridade crítica, as seis segundas com prioridade elevada e as últimas três com prioridade média (Tabela 2), estando as estirpes bacterianas focadas neste estudo, *Escherichia coli* produtoras de ESBL, englobadas no primeiro grupo de prioridade crítica (*Enterobactericeae* resistentes às cefalosporinas de 3ª geração).

Tabela 2 Lista de bactérias patogénicas prioritárias para a investigação e desenvolvimento de novas bactérias (Adaptado de WHO, 2017)

Ordem	Bactérias
1.	***Acinetobacter baumannii***, resistente às carbapenemases
2.	***Pseudomonas aeruginosa***, resistente às carbapenemases
3.	***Enterobactericeae***, resistente às carbapenemases e cefalosporinas de 3ª geração
4.	***Enterococcus faecium***, resistente à vancomicina
5.	***Staphylococcus aureus***, resistente à meticilina e vancomicina
6.	***Helicobacter pylori***, resistente à claritromicina
7.	***Campylobacter***, resistente às fluoroquinolonas
8.	***Salmonella* spp.**, resistente às fluoroquinolonas
9.	***Neisseria gonorrhoeae***, resistente às cefalosporinas de 3ª geração e fluoroquinolonas
10.	***Streptococcus pneumoniae***, não susceptível à penicilina
11.	***Haemophilus influenzae***, resistente à ampicilina
12.	***Shigella* spp.**, resistente às fluoroquinolonas

Algo interessante, que este relatório da OMS relata, é a falta de dados de vigilância relativamente aos animais e alimentos, exigindo portanto uma melhoria na coordenação entre os sistemas de vigilância humano e animal, consequentemente, estudos como este podem revelar-se importantes para monitorizar a dispersão das bactérias resistentes aos antibióticos.

Actualmente, e na esperança de travar o avanço e a evolução preocupante das bactérias multirresistentes, a UE desenvolveu um plano estratégico de acção para reduzir a disseminação destes microorganismos. As implicações económicas, sociais e políticas desta problemática exigem a tomada de medidas globais, coordenadas e multidisciplinares em três áreas distintas, humana, veterinária e mista (ECDC 2009; Roca *et al.* 2015). Assim sendo, a nível hospitalar são sugeridas as seguintes medidas:

1. Implementação de programas de vigilância e de medidas de controlo de infecções;
2. Detecção e triagem de todos os pacientes, universalmente, quanto a bactérias multirresistentes;
3. Avaliação da duração dos tratamentos feitos com antibióticos;
4. Desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico, rápidas e de baixo custo;
5. Desenvolvimento de novos fármacos;

6. Reforço dos regulamentos hospitalares a nível nacional e internacional.

A nível das comunidades e da indústria são feitas as seguintes sugestões:

1. Programas educativos para os utilizadores de antibióticos;
2. Avaliação ao consumo de antibióticos;
3. Avaliação da prevalência de estirpes bacterianas multirresistentes;
4. Actualização das directrizes para a prescrição de antibióticos;
5. Vigilância activa, melhoramento do saneamento;
6. Reforço dos regulamentos industriais a nível nacional e internacional.

A nível alimentar, nas fontes de água e alimentos, as seguintes directrizes são apontadas:

1. Avaliação das concentrações de antibióticos no saneamento e nas estações de tratamento de águas residuais;
2. Melhoraria do saneamento dos sistemas industriais de produção alimentar;
3. Descontaminação das águas residuais dos hospitais;
4. Reforço dos regulamentos alimentares e de descargas de poluentes a nível nacional e internacional.

A nível da agricultura e produção animal são feitas as seguintes sugestões:

1. Eliminação/regulamentação da utilização dos antibióticos como promotores de crescimento a nível internacional;
2. Melhoraria das medidas de biossegurança nas explorações animais;
3. Reforço dos sistemas de vigilância conjuntos Homem/animal;
4. Reforço dos regulamentos a nível nacional e internacional.

Com o desenvolvimento do plano de estratégico e de acção por parte da UE, cada estado membro criou um plano adaptado às necessidades do seu país, contudo estes planos estão focados nos hospitais e nas infecções nosocomiais (Tacconelli *et al.* 2014). Em Espanha foi criado o denominado "Proyecto Resistencia Zero", com o objectivo de reduzir a taxa de pacientes ingressados nas urgências com bactérias multirresistentes de origem nosocomial. Para tal foi desenvolvido um protocolo rigoroso para ser implementado em todas as unidades de saúde do país, do qual constavam uma interessante lista de 10 recomendações/normas que foram chamadas de "El Decálogo" (Figura 11).

Figura 11 Lista de 10 normas/recomendações feitas pelo plano estratégico para redução das infecções nosocomiais por bactérias multirresistentes em Espanha, chamado "Proyecto Resistencia Zero"

Como é possível verificar, por estas medidas sugeridas, a problemática da resistência aos antibióticos implica actualmente vários sectores importantes da sociedade, portanto é necessária a formação de profissionais, são necessárias campanhas de sensibilização para informar a população, é necessária uma vigilância constante, é necessário limitar a utilização dos antibióticos e são necessárias alternativas aos antibióticos existentes, para tal é necessária investigação. É nesse campo da investigação que se foca a secção final desta introdução, na procura de novos antibióticos ou mesmo de alternativas aos antibióticos.

1.6.1 Alternativas ao uso de antibióticos

Com a redução dos investimentos na área farmacêutica relativamente à produção de novos antibióticos e com a exponencial dispersão de bactérias multirresistentes, foi necessário concentrar esforços na investigação de alternativas viáveis à utilização dos actuais antibióticos que pouco a pouco se tornam obsoletos. A importância da problemática da resistência aos

antibióticos levou a comunidade científica à procura destas alternativas, e nesta secção são apontadas e sugeridas algumas linhas de investigação.

Vários factores, na sua maioria económicos, levaram os pequenos e grandes grupos farmacêuticos a abandonar a pesquisa e descoberta de novos antibióticos, como: a) dificuldade em prever a evolução das resistências aos antibióticos; b) riscos elevados para o investimento; c) regulamentos e legislação complexa e divergente; d) o facto de requerer alto investimento e de produzir uma receita mais baixa comparativamente a outros fármacos; e e) o facto de serem tratamentos rápidos que produzem, consequentemente, rendimentos mais reduzidos (Roca *et al.* 2015). Pequenos grupos de investigação, unidos com empresas farmacêuticas em projectos de investigação, têm conseguido fazer alguns progressos relevantes, resumidos por Roca e colaboradores na Tabela 3.

Tabela 3 Estratégias para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos (Adaptado de Roca *et al*., 2015)

Estratégia	Descripção
Derivados de antibióticos	Modificar a estrutura básica de antibióticos já conhecidos ou desenvolver inibidores dos mecanismos de resistência conhecidos
Novos antibióticos	Avaliação da produção de antibióticos por outros microorganismos de distintas fontes
	Ferramentas combinadas entre áreas distintas como a genómica e a química
Antivirais	Compostos químicos de inibição dos factores de virulência ou anticorpos
Nanopartículas	Desenvolvimento de péptidos antibacterianos
Bacteriófagos	Desenvolvimento de bacteriófagos ou enzimas fagolíticas
Abordagem ecológica	Desenvolvimento de inibidores de transferência plasmídica ou oligómeros silenciadores de genes

Outras alternativas, que se afastam um pouco das linhas tradicionais de investigação, foram também estudadas e desenvolvidas:

1. Probióticos: os probióticos são constituídos por microorganismos não patogénicos benéficos para a flora intestinal através da modificação da sua ecologia. Assim sendo, os probióticos são microorganismos que sobrevivem à digestão gástrica, biliar e pancreática, capazes de induzir uma resposta do seu hospedeiro aquando da entrada no ecossistema

intestinal e que possuem uma função clínica benéfica para os hospedeiros (Saavedra 2007). Geralmente presentes em alimentos fermentados e produtos lácticos, as bactérias produtoras de ácido láctico dos géneros *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* e *Streptococcus* são das mais utilizadas em produtos alimentares (Saavedra 2007). A capacidade dos probióticos em moldar a mucosa intestinal e combater estirpes patogénicas através da produção de compostos químicos provou ser extremamente benéfica em casos de diarreia produzida pela bactéria *Clostridium difficile* (D'Souza *et al.* 2002; Lau e Chamberlain 2016; Rohde *et al.* 2009). Outros estudos defendem ainda a capacidade, tanto dos prebióticos como dos probióticos, como alternativas preventivas à utilização de antibióticos (Hume 2011);

2. Mel: de forma semelhante aos probióticos, um estudo recente identificou 13 bactérias produtoras de ácido láctico, presentes em amostras de mel puro (Olofsson *et al.* 2016). Estas amostras de mel foram testadas em isolados de MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* resistente à vancomicina e apresentaram resultados surpreendentes. Interessante é perceber que já na civilização egípcia o mel era utilizado frequentemente, contudo, este estudo explica com mais pormenor o porquê de tal utilização (McKenna e McKenna 1998). Tobias Olofsson e seus colaboradores observaram que as bactérias lácticas, em conjunto, produziam compostos que sozinhas não conseguiam. Ao contrário dos antibióticos, que actualmente são compostos apenas por uma substância activa. Estes investigadores sublinharam ainda que estas características só podem ser observadas em mel puro, pois o mel vendido hoje em dia passa por processos de pasteurização que eliminam todas as bactérias e retiram a capacidade e propriedade preventiva do mel (Olofsson *et al.* 2016);

3. Equinodermes: a produção de moléculas bioactivas é inata do sistema imunológico dos seres vivos. Um estudo relativamente recente, focou-se em péptidos antimicrobianos produzidos pelo sistema imunitário de ouriços-do-mar e de pepinos do mar, que apresentaram actividade no combate a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Schillaci e Arizza 2013).

1.7 Associação das Técnicas, PFGE, MLST, Conjugação e PBRT

No contexto desta dissertação é importante fazer a ligação entre as distintas técnicas utilizadas durante o estudo. São técnicas que se complementam e que, juntas, permitem uma

caracterização ampla da diversidade clonal, da diversidade plasmídica e da virulência das estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL.

A técnica de electroforese em campo pulsado (PFGE) permite determinar o grau de proximidade e de relacionamento entre um determinado grupo de isolados, de forma a identificar clones semelhantes. A utilidade desta técnica reside na capacidade de controlar e compreender a dispersão de determinada estirpe (Tenover *et al.* 1995). Geralmente, os isolados comparados devem ser obtidos na mesma área, durante o mesmo período de tempo e de origens comuns, contudo, neste estudo as origens eram bastante variadas. Apesar de esta técnica ser bastante útil e eficaz em termos de tipificação de estirpes, é muito específica e não permite obter informação epidemiológica. Tenover e colaboradores sugerem mesmo que tanto os dados clonais como os dados epidemiológicos devem ser estudados independentemente, mas devem ser analisados em conjunto (Tenover *et al.* 1995). É então que, na busca de informação epidemiológica complementar, é necessário utilizar outra técnica.

A tipificação de sequências *multilocus* (MLST), permite obter informações epidemiológicas complementares. De forma semelhante à identificação dos grupos filogenéticos, a detecção das sequências tipo (ST) permite avaliar o grau de patogenicidade dos isolados e, adicionalmente à técnica de PFGE, permite entender e avaliar a disseminação das estirpes resistentes aos antibióticos. Esta técnica permite identificar rapidamente os complexos clonais e clones bacterianos, algo extremamente útil, pois a propensão das bactérias para desenvolver doença depende em larga escala com a sua origem filogenética (Clermont *et al.* 2015). Assim sendo, esta duas técnicas são complementares, enquanto a primeira permite fazer uma comparação clonal num grupo maior e mais distinto de isolados, a segunda caracteriza cada clone mais especificamente e permite obter dados da patogenicidade dos isolados. A combinação de ambas as técnicas é algo comum em estudos de resistência aos antibióticos, existindo até alguns que conseguem combinar ambas as técnicas apenas num dendrograma (Skaare *et al.* 2014).

As técnicas descritas previamente permitem avaliar a dimensão da dispersão de determinadas estirpes, as técnicas descritas em seguida permitem estudar e compreender os mecanismos que permitem que determinados genes de resistência se dispersem nos mais variados ambientes. As bactérias, como *Escherichia coli*, possuem informação genética extracromossómica, capaz de se replicar e de ser transferida entre células bacterianas distintas, esta informação é geralmente transportada por plasmídeos. O transporte de genes de

resistência pelos plasmídeos e de factores de virulência, permite a determinados isolados adaptarem-se em meios específicos onde existe pressão selectiva, sendo portanto uma vantagem para as células bacterianas (Carattoli 2011). As experiências de conjugação associadas ao estudo dos plasmídeos permitem identificar os plasmídeos mais comuns na transmissão de genes de resistência. Estes elementos móveis são identificados e classificados através da sua estabilidade durante os processos de conjugação, separando-os por grupos de incompatibilidade (incapacidade de dois plasmídeos do mesmo grupo se propagarem com estabilidade na mesma célula) (Novick 1987). A técnica utilizada para classificar os plasmídeos é denominada de PBRT ("PCR-Based Replicon Typing") e tem como alvo os replicões das principais famílias de plasmídeos (Carattoli 2009; Carattoli *et al.* 2005).

Desta forma, estas quatro técnicas combinadas podem ser úteis para analisar a distribuição na natureza das estirpes bacterianas, a relação entre as bactérias e a origem e evolução dos isolados. Resumindo, a electroforese em campos pulsados (PFGE) e a tipicação de sequência *multilocus* (MLST) são extremamente úteis para perceber o quão dispersas estão determinadas estirpes; e a conjugação e a tipificação dos replicões (PBRT), são úteis na mesma área, mas acrescentam a compreensão dos mecanismos de dispersão e transferência dos genes de resistência. Todas as técnicas se complementam e permitem um estudo mais completo, existindo estudos prévios que associam as sequências tipo (ST) estudadas através de MLST, com os genes beta-lactâmicos e com os grupos de incompatibilidade dos plasmídeos (Carattoli 2011).

Objectivos

“Goals should never be easy.”

- Michael Phelps -

Capítulo 2 – Objectivos

Foram objectivo deste trabalho:

1. Estudar os fenótipos de resistência antibacteriana das estirpes previamente identificadas, envolvendo: a avaliação da susceptibilidade das bactérias em relação aos antibióticos de forma qualitativa através do método de Kirby e Bauer, utilizando discos de antibióticos; a determinação fenotípica da produção de β-lactamases de espectro extenso (ESBL) através do método de difusão de discos, utilizando cefotaxima, ceftazidima, amoxicilina e ácido clavulânico; a extracção e quantificação de ADN bacteriana para posterior utilização em reacções de PCR (*polymerase chain reaction*), como a análise dos grupos filogenéticos das estirpes identificadas que é realizada através de uma reacção de PCR-*multiplex*, sendo que estirpes pertencentes aos grupos filogenéticos B2 e D serão ainda analisadas através de MLST (*multilocus sequece typing*) de forma a detectar estirpes altamente virulentas;

2. Analisar a diversidade clonal das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL através de PFGE, fazendo o estudo da relação clonal entre os isolados de *E. coli* produtores de ESBL através de electroforese em campo pulsado (PFGE) e posterior análise dos padrões obtidos com recurso a *software* informático de construção de dendrogramas;

3. Verificar a transferência de genes de resistência entre bactérias com padrões multirresistentes, fazendo a selecção de estirpes dadoras conjugáveis através de parâmetros previamente definidos (padrão de PFGE, concentração mínima inibitória à rifampicina, animal de origem) e posterior experiência de conjugação em meio líquido Luria Bertani, análise das estirpes conjugantes através de sementeira em meio selectivo e análise fenotípica das estirpes transconjugantes obtidas; e

4. Detetar plasmídeos R obtidos através de conjugação, implicando a obtenção de plasmídeos resistentes através do método de conjugação previamente descrito e análise dos replicões presentes nos plasmídeos das estirpes dadoras e transconjugantes através de PCR-*based pelicon-typing*.

Material e Métodos

"We learn to do by doing."

- Denzel Washington -

Capítulo 3 – Material e Métodos

3.1 Isolados de *Escherichia coli*

Foram analisadas e comparadas 53 estirpes de *E. coli* isoladas a partir de amostras fecais, todas provenientes de estudos realizados previamente pelo grupo de investigação, num total de nove espécies distintas de animais selvagens: 14 estirpes isoladas de amostras fecais de lobo Ibérico (*Canis lupus signatus*) (Goncalves *et al.* 2012b), 10 isoladas a partir de douradas (*Sparus aurata*) (Sousa *et al.* 2011), 9 isoladas de lince Ibérico (*Lynx pardinus*) (Goncalves *et al.* 2012a), 8 de javali (*Sus scrofa scrofa* L.) (Poeta *et al.* 2009), 4 de aves de rapina (Costa *et al.* 2006), 3 isolados a partir de raposas, dos quais, 2 eram de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) (Costa *et al.* 2006; Radhouani *et al.* 2013a), 2 de aves do arquipélago dos Açores (*Sylvia atricapilla*) (Silva *et al.* 2011), 2 isoladas a partir de veados e uma isolada a partir de amostras fecais de coruja (Costa *et al.* 2006). Todas as amostras foram colhidas em território ibérico, entre Portugal e Espanha, no período 2003-2010 (Tabela 2).

As amostras fecais dos diversos animais gozaram de diferentes métodos de colheita. As colheita das amotras fecais de lobo Ibérico foram realizadas por uma organização não governamental de conservação desta espécie, durante estudos de vigilância e monitorização. As amostras de dourada foram colhidas por praticantes de pesca desportiva. As amostras fecais de lince Ibérico foram colhidas durante procedimentos clínicos e de monitorização pela entidade responsável pela preservação desta espécie. As de javali selvagem foram colhidas após a caça ao javali organizada por diferentes conjuntos de caça. Semelhante cenário de colheita ocorreu com as raposas vermelhas. As amostras fecais de aves do arquipélago dos Açores foram colhidas utilizando redes para captura dos animais pelo Centro de Biodiversidade e Genética da Universidade dos Açores. Por, fim as amostras fecais de animais variados foram colhidas em ambiente natural em Parques Naturais.

Todo este processo de isolamento e selecção das bactérias foi previamente realizado noutros estudos (Tabela 4), e foi a partir destes isolados de *Escherichia coli* que foi desenvolvido este estudo de diversidade plasmídica. Devido ao largo período de tempo que as amostras foram mantidas e conservadas em meio de leite desnatado, algumas análises já

realizadas nos estudos anteriores, foram novamente reproduzidas de forma a comprovar a fiabilidade dos isolados.

Tabela 4 Proveniência e número de amostras fecais de animais selvagens analisadas

Animal (Espécie)	Nº de amostras	Artigo	Autor	Local de recolha	Data de recolha
Lobo Ibérico (*Canis lupus signatus*)	14	"Iberian Wolf as a Reservoir of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Escherichia coli* of the TEM, SHV and CTX-M Groups"	Gonçalves et al.	PORTUGAL (Falperra, Minhéu, Alvão, Padrela e Candedo)	2008-2009
Dourada (*Sparus aurata*)	10	"Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) as Carriers of SHV-12 and TEM-52 Extended-Spectrum Beta-Lactamases-Containing *Escherichia coli* Isolates"	Sousa et al.	PORTUGAL (Oceano Atlântico, Costa Oeste, Peniche)	2007
Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	9	"Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of Iberian Lynx"	Gonçalves et al.	ESPANHA (Parque Nacional de Doñana e Serra Morena)	2008-2010
Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	8	"Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups"	Poeta et al.	PORTUGAL (Norte de Portugal)	2005-2007
Raposa Vermelha (*Vulpes vulpes*)	2	"Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from red foxes in Portugal"	Radhouani et al.	PORTUGAL (Norte de Portugal)	2008-2009
Aves Açores (*Sylvia atricapilla*)	2	"Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β-lasctamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago"	Silva et al.	PORTUGAL (Arquipélago dos Açores)	2010
Aves de Rapina	4	"Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal"	Costa et al.	PORTUGAL (Parques Naturais, Norte e Centro de Portugal)	2003-2004
Raposa	1				
Veado	2				
Coruja	1				

3.2 Estudo da Sensibilidade aos Antibióticos

3.2.1 Classes de antibióticos testadas

Através do método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer, cuja metodologia será explicada de seguida, todos os isolados de *E. coli* foram testados para a sensibilidade a 16 antibióticos: ampicilina (10 µg), amoxicilina +ácido clavulânico (20 + 10 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), imipenemo (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), amicacina (30 µg), tobramicina (10 µg), estreptomicina (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (1,25 + 23,75 µg) e ainda cloranfenicol (30 µg) (Tabela 5).

Tabela 5 Antibióticos testados em *E. coli* e respectivo valor dos halos de inibição (Adaptado de CLSI, 2014)

Antibiótico	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	Resistente (R)	Intermédio (I)	Sensível (S)
Ampicilina	≤13	14–16	≥17
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	≤13	14–17	≥18
Cefoxitina	≤14	15–17	≥18
Cefotaxima	≤22	23–25	≥26
Ceftazidima	≤17	18–20	≥21
Aztreonam	≤17	18–20	≥21
Imipenemo	≤19	20–22	≥23
Ciprofloxacina	≤15	16–20	≥21
Gentamicina	≤12	13–14	≥15
Tetraciclina	≤11	12–14	≥15
Amicacina	≤14	15–16	≥17
Tobramicina	≤12	13–14	≥15
Estreptomicina	≤11	12–14	≥15
Ácido Nalidíxico	≤13	14–18	≥19
Sulfametoxazol/trimetoprim	≤10	11–15	≥16
Cloranfenicol	≤12	13–17	≥18

Todos os antibióticos utilizados durante o estudo possuíam a forma de disco e respeitaram as concentrações recomendadas pelo "*Clinical and Laboratory Standards Institue*" (CLSI) (CLSI 2014). Este ensaio pela técnica de Kirby-Bauer consiste em aplicar em

placas com meio Muller-Hinton, previamente semeadas com o microorganismo a ser testado, discos com diferentes antibióticos, a diferentes concentrações. Após o contacto do disco com a superfície húmida do meio de cultura, ocorre a difusão do antibiótico para o meio. Depois de incubação durante 24 horas a 37ºC, e consequente crescimento das bactérias, é possível observar a formação de halos de inibição em volta dos discos de antibiótico. A análise do diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição, permite separar as diferentes estirpes como resistentes (R), com resistência intermédia (I) e sensíveis (S) aos antibióticos. A leitura deve ser feita segundo a regra que diz que o diâmetro do halo de inibição é inversamente proporcional à resistência da estirpe em relação a determinado antibiótico. Os diâmetros dos halos de inibição de cada antibiótico variam para cada bactéria e para cada antibiótico. Na Tabela 5 estão dispostos os valores de referência para *Escherichia coli* e para os antibióticos utilizados durante o estudo.

3.2.2 Determinação da sensibilidade aos antibióticos

Para análise da susceptibilidade aos antibióticos, como previamente referido, foi utilizado o método da difusão em agar pela técnica de Kirby-Bauer, com posterior interpretação seguindo as normas do CLSI (CLSI 2014). Durante o desenvolvimento desta dissertação, este método foi realizado duas vezes, em situações e tempos diferentes: no início, para verificar a fiabilidade dos isolados e verificar se o fenótipo de resistência se mantinha inalterado; próximo do final, para identificar o fenótipo de resistência das estirpes transconjugantes obtidas e comparar com o fenótipo das estirpes dadoras. Esta técnica, descrita previamente, é bastante simples e fácil de reproduzir, e possui apenas dois passos:

1. Preparação do inóculo: os isolados puros preservados em meio de leite foram descongelados (o mínimo possível), foram semeados em placas com meio BHI-agar devidamente identificadas e incubados durante 24 horas a 37ºC numa estufa. Entretanto, foram preparados tubos de ensaio com 3mL de solução salina esterilizada (NaCl a 0,9%). Após as 24 horas de incubação, foram repicadas duas a três colónias para os tubos com 3 mL de solução salina, com o auxílio de uma ansa, até se obter uma turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland (de 0,5 a 10) (McFarland 1907);

2. Inoculação da placa: em seguida, com uma zaragatoa esterilizada, embebida na solução salina com o isolado de *Escherichia coli* em suspensão, semeou-se a superfície de

uma placa, devidamente identificada, de MH, na sua totalidade e de forma homogénea. Após semear a placa na sua totalidade em todas as direcções, com o auxílio de uma pinça, foram colocados os discos de antibiótico, num máximo de seis discos por placa. Incubaram-se as placas de MH em estufa a 37ºC durante 24 horas. Após esse período de incubação mediram-se os diâmetros dos halos de inibição e avaliou-se o seu valor segundo os valores referidos na Tabela 3.

3.2.2 Determinação fenotípica da produção de β-lactamases de largo espectro

Para identificar se fenotipicamente o isolado de *Escherichia coli* é produtor de β-lactamases de largo espectro, é necessário realizar uma prova muito semelhante ao teste anterior de determinação do fenótipo de resistência aos antibióticos.

O processo de preparação do inóculo e de sementeira com auxílio de zaragatoa em placa com meio MH é igual ao realizado na prova anterior. O que varia na determinação fenotípica da produção de beta-lactamases são os antibióticos utilizados: ceftazidima, cefotaxima, aztreonam e a amoxicilina + ácido clavulânico no meio dos outros três antibióticos. Após a colocação dos discos de antibiótico com o auxílio de pinça, em forma de T e com cerca de 2 cm entre cada um, as placas devidamente identificadas são incubadas em estufa a 37ºC durante 24 horas (Figura 12).

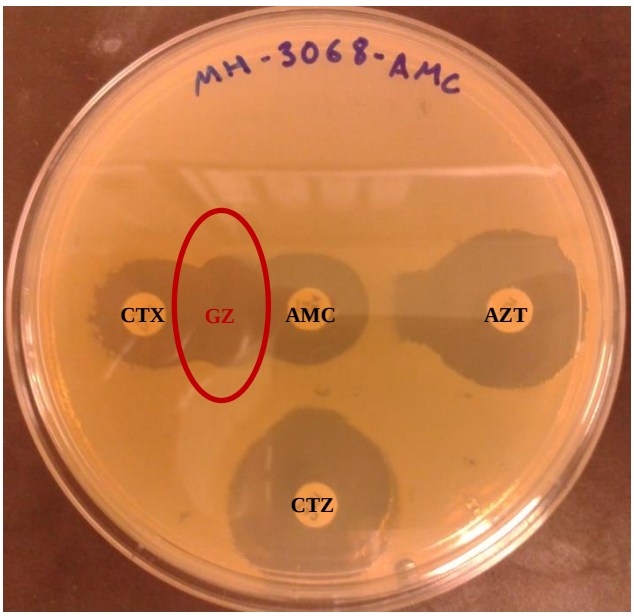


Figura 12 Isolado com fenótipo positivo para produção de β-lactamases de largo espectro (imagem do autor). GZ-Zona fantasma; AMC- amoxixilina+ácido clavulânico; CTZ-ceftazidima; CTX-cefotaxima; AZT-aztreonam

Para se identificar um fenótipo positivo para produção de beta-lactamases de espectro largo, tem de se verificar a seguinte situação: junto da área de interface entre os discos de ceftazidima (CTZ), cefotaxima (CTX) e aztreonam (AZT) com o de amoxicilina + ácido clavulânico (AMC), forma-se uma ampliação do halo inibição denominado de zona fantasma ("ghost zone"). Esta ampliação do halo ocorre devido à inibição das enzimas β-lactamases, por parte do ácido clavulânico, permitindo a actuação da amoxicilina, um antibiótico β-lactâmico. Este fenótipo aqui descrito pode ser observado na Figura 12, apesar de não ser o melhor exemplo, pois não possui as zonas fantasma em todos as áreas de interface dos antibióticos.

3.3 Caracterização Genotípica dos Isolados

De forma a colmatar algumas lacunas na caracterização genotípica dos isolados previamente estudados, foi necessário fazer a extracção de ADN e posterior quantificação e amplificação de sequências específicas de ADN através da reacção em cadeia por acção da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). A inexistência da análise dos grupos filogenéticos de alguns isolados, a necessidade de fazer a tipificação de outors com possíveis factores de virulência elevados e a análise dos plasmídeos através de "PCR-*based replicon typing*" (PBRT), levou à implementação destes métodos durante o desenvolvimento desta dissertação (Carattoli *et al.* 2005; Clermont *et al.* 2000; Clermont *et al.* 2014).

3.3.1 Extracção de ADN

Como a quantidade de ADN necessária para realizar uma reacção de PCR é bastante reduzida, foi utilizada uma técnica de extracção de ADN rápida, simples e igualmente eficaz. Para realizar a extracção de ADN de *Escherichia coli*, foi eleito o método fervido. Este método baseia-se na ruptura celular provocada pela elevada temperatura da água, levada à ebulição, o que permite a saída do conteúdo celular que fica em suspensão (Holmes e Quigley 1981). A aplicação do método fervido para a extracção de ADN de *E. coli* consiste nos seguintes passos:

1. Preencher um determinado número (igual ao número de isolados para extracção) de *eppenforfs* de 1mL, com 500µL de água destilada esterilizada (através de autoclavagem) e identificá-los devidamente;

2. Com o auxílio de uma ansa, suspender uma pequena quantidade de estirpe bacteriana pura, retirada de uma cultura pura em placa de BHI durante 24 horas a 37ºC;

3. Agitar vigorosamente no vórtex durante 30 segundos;

4. Colocar os epperdorfs com a suspensão e devidamente identificados, num banho de água a 100ºC durante 8 minutos, tendo sempre em atenção e evitando a abertura dos *microtubos* devido à pressão criada dentro dos mesmos;

5. Após esfriar ligeiramente, levar novamente ao vórtex e centrifugar a 12 000 rpm durante 3 minutos, de modo a ser visível um *pellet* (precipitado branco) no fundo do *microtubo*, com todo o material celular excepto o ADN;

6. Retirar o sobrenadante, onde se encontra o ADN, com o auxílio de uma micropipeta, e colocar num novo *microtubo* limpo e devidamente identificado;

7. Análisar a concentração e a pureza do ADN obtido;

8. Conservar os *microtubos* no frio, a 4ºC, para posterior utilização nas reacções de PCR.

3.3.2 Quantificação de ADN

A medição da concentração e pureza do ADN de *Escherichia coli* obtido foi realizada através da leitura da absorvância a 260 e a 280nm, utilizando o espectrofotómetro ND-100 Spectophotometer, NanoDrop®. Para tal, é necessário colocar 2µL de uma amostra de ADN extraído no poço e automaticamente o aparelho realiza uma leitura das absorvâncias necessárias.

Para a medição da concentração de ADN é necessário atentar-se na leitura a 260nm. A concentração ideal para a realização da PCR deve variar entre 300 e 600µg/mL, isto considerando que uma unidade de densidade óptica equivale a 50µg/mL de ADN de cadeia

dupla. No caso de as concentrações ultrapassarem estes valores, é necessário proceder à sua diluição utilizando água destilada esterilizada.

Relativamente à medição da pureza do ADN, esta é dada pelo quociente entre as duas absorvâncias obtidas (260 e 280nm). Para obter uma preparação pura de ADN, este quociente de pureza deve encontrar-se entre 1,8 e 2. Um valor inferior a este intervalo é geralmente sinal de contaminação com moléculas proteicas.

Após todo este processo de análise da concentração e pureza do ADN, pode-se guardar os *microtubos* de ADN extraído a 4ºC até utilização em reacções de PCR.

3.3.3 Reacção em cadeia pela polimerase (PCR, "*polymerase chain reaction*")

A técnica de PCR, ou seja a reacção em cadeia pela acção da ADN polimerase, consiste na amplificação de uma sequência específica de ADN delimitada por um conjunto de *primers*, tudo isto com o auxílio da enzima ADN polimerase. A reacção é constituída por três fases fundamentais: a desnaturação, o *annealing* ou fase de ligação e a extensão. Com o auxílio de um termociclador *T300* Thermocycler, Biometra®, as três fases consistem em variações de temperatura. Todo o ciclo é então repetido várias vezes, para que seja obtida uma grande amplificação de ADN com um elevado número de cópias (Pierce 2002).

Para que ocorra esta reacção são necessários vários reagentes, que juntos permitem a amplificação do ADN em várias cópias. Todos os componentes são adicionados em mini *microtubos* devidamente identificados e com tamanho adequado para o termociclador. Cada *microtubo* é preenchido com a mistura de reacção e o ADN de uma amostra diferente. É também importante referir que, consoante a reacção de PCR, e a necessidade de sequenciar ou não, o volume final em cada tubo de reacção pode variar entre 20 µL, 25µL ou 50µL. Por exemplo, quando é necessário fazer a sequenciação das amostras de ADN, o volume final de reacção deve ser de 50µL. Os componentes e os seus volumes podem ser observados na Tabela 6. Ao conjunto de *microtubos* com as amostras de ADN foram adicionados dois controlos, um negativo e um positivo. No controlo negativo, a quantidade de ADN é substituída por 10µL de água miliQ esterilizada, com o objectivo de controlar possíveis contaminações. Já o controlo positivo, contém sempre uma estirpe confirmada para a presença

dos genes de interesse, por sequenciação. Os controlos positivos utilizados durante este estudo foram gentilmente cedidos pela Universidade de La Rioja (UR).

Tabela 6 Volumes e concentrações dos reagentes usados nas reacções de PCR

Componentes	**Concentração inicial**	**Volume 20µL (por tubo)**	**Volume 25µL (por tubo)**	**Volume 50µL (por tubo)**
Água miliQ esterilizada	-	12,6µL	15,475µL	30,2µL
Tampão de reacção NH_4 (Buffer Bioline)	10x	2µL	2,5µL	5µL
$MgCl_2$ (Bioline)	50mM	0,6µL	0,375µL	1,5µL
dNTPs	2,5/10mM	0,8µL	0,5µL	1µL
Primer forward	25µM	0,8µL	0,5µL	1µL
Primer reverse	25µM	0,8µL	0,5µL	1µL
BIOTAQ™ ADN polimerase (Bioline)	5U/µL	0,4µL	0,15µL	0,3µL
ADN	-	2µL	5µL	10µL
TOTAL	-	20µL	25µL	50µL

3.3.3.1 *Primers* e condições de PCR utilizados

Dependendo da região alvo e do tamanho do fragmento de ADN a ampliar, várias factores devem variar. As sequência dos *primers* variam, obviamente, consoante a cadeia unifilamentar à qual se têm de ligar. O que varia também são as condições da reacção de PCR, como o número ciclos, bem como a sua duração.

Durante o desenvolvimento do trabalho prático foram utilizadas duas reacções de PCR distintas, uma para colmatar lacunas de informação no estudos prévios e outra de interesse para este estudo, para o enriquecer e aprofundar:

▪ **Determinação do grupo filogenético em *Escherichia coli:*** a importância deste estudo para avaliar o grau de patogenicidade dos isolados e perceber a evolução e disseminação da resistência aos antibióticos, levou à aplicação desta reacção de PCR em nove amostras que não tinham sido analisadas relativamente a este aspecto (Costa *et al.* 2006). O protocolo utilizado permitiu, de maneira rápida e eficiente, determinar o grupo filogenético destas amostras (Clermont *et al.* 2000). Desta forma, apenas com a realização de uma reacção de PCR e com a utilização de três pares distintos de *primers* (*chu*A, *yja*A e *tsp*E4.C2), como é

visível na Tabela 7, foi possível dividir os isolados pelos quatro possíveis grupos filogenéticos existentes.

Tabela 7 Sequências nucleotídicas dos primers de PCR para a determinação dos grupos filogenéticos em *Escherichia coli* e condições respectivas condições de amplificação (Adaptado de Clermont *et al*., 2000)

Gene ou região alvo	Produto de PCR (pb)	Sequência dos *primers* (5'→3')	Condições de amplificação
***chu*A**	279	GAC GAA CCA ACG GTC AGG AT TGC CGC CAG TAC CAA AGA CA	94ºC, 5', 1 ciclo 94ºC, 30'' 55ºC 30'' 72ºC, 30'' 30 ciclos 72ºC, 7', 1 ciclo
***yja*A**	211	TGA AGT GTC AGG AGA CGC TG ATG GAG AAT GCG TTC CTC AAC	
***tsp*E4.C2**	152	GAG TAA TGT CGG GGC ATT CA CGC GCC AAC AAA GTA TTA CG	

▪ **Tipificação de sequências *multilocus* (MLST, "*multilocus sequence typing*"):** como as amostra designadas com o grupo filogenético B2 e D estão geralmente associadas a fenótipos altamente virulentos, que acumulam factores de virulência extraintestinais, foi necessário realizar uma caracterização mais profunda destes isolados (Clermont *et al.* 2000). Com esse objectivo foram estudados sete genes *housekeeping* (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) através de MLST, o que permitiu a determinação das sequências tipo (ST) e dos complexos clonais (Tartof *et al.* 2005). Esta técnica, morosa mas eficaz, exige a realização de sete reacções de PCR distintas, devido à diferente temperatura de *annealing* para cada par de *primers*, como se pode comprovar nas Tabela 8 e 9. A técnica exige ainda uma posterior sequenciação e uma análise através da base de dados MLST *Database* da Universidade de Warwick (Coventry, Inglaterra) (mlst.warwick.ac.uk), para detectar estirpes virulentas extraintestinais (Wirth *et al.* 2006).

Tabela 8 Sequências nucleotídicas dos primers de PCR para a amplificação de 3 dos 7 genes *housekeeping* para a tipificação por MLST (Adaptado de Tartof *et al*., 2005 e Vinué, 2010)

Gene ou região alvo	Produto de PCR (pb)	Sequência dos *primers* (5'→3')	Condições de amplificação
gyrB	880	TCG GCG ACA CGG ATG ACG GC ATC AGG CCT TCA CGC GCA TC	95ºC, 3', 1 ciclo 95ºC, 1' 60ºC, 1' 72ºC, 2' 30 ciclos 72ºC, 2', 1 ciclo
recA	734	CGC ATT CGC TTT ACC CTG ACC TCG TCG AAA TCT ACG GAC CGG A	
mdh	932	ATG AAA GTC GCA GTC CTC GGC GCT GCT GGC GG TTA ACG AAC TCC TGC CCC AGA GCG ATA TCT TTC TT	

Tabela 9 Continuação das sequências nucleotídicas dos primers de PCR para a amplificação de 4 dos 7 genes *housekeeping* para a tipificação por MLST (Adaptado de Tartof *et al*., 2005 e Vinué, 2010)

Gene ou região alvo	Produto de PCR (pb)	Sequência dos *primers* (5'→3')	Condições de amplificação
adk	583	ATT CTG CTT GGC GCT CCG GG CCG TCA ACT TTC GCG TAT TT	95ºC, 3', 1 ciclo 95ºC, 1' 54ºC, 1' 72ºC, 2' 30 ciclos
fumC	806	TCA CAG GTC GCC AGC GCT TC GTA CGC AGC GAA AAA GAT TC	
icd	878	ATG GAA AGT AAA GTA GTT GTT CCG GCA CA GGA CGC AGC AGG ATC TGT T	
purA	816	CGC GCT GAT GAA AGA GAT GA CAT ACG GTA AGC CAC GCA GA	72ºC, 2', 1 ciclo

3.3.4 Electroforese em gel de agarose

Após a obtenção dos fragmentos de ADN amplificados pela técnica de PCR, para fazer a sua separação e posterior visualização, foi necessário efectuar a técnica da electroforese horizontal em gel de agarose com brometo de etídeo incorporado. Este processo é constituído por três fases distintas: a preparação do gel de agarose, a inserção dos produtos de PCR e a visualização do gel de agarose, como se explica a seguir:

1. Preparação do gel de agarose: durante o estudo utilizaram-se géis com concentração de agarose entre 1% e 2%, dependendo do tamanho do amplicões a detectar (Tabela 10).

Tabela 10 Relação entre a concentração de agarose no gel de electroforese e tamanho do amplicão a ser analisado

Tamanho dos amplicões	Concentração da agarose	Reagentes e quantidades	
		100mL (gel grande)	**50mL (gel pequeno)**
>800 pb	1%	1g agarose	0,5g agarose
		100mL TBE 1x	50mL TBE 1x
		5µL de brometo de etídeo	2,5µL de brometo de etídeo
300-800 pb	1,5%	1,5g agarose	0,75g agarose
		100mL TBE 1x	50mL TBE 1x
		5µL de brometo de etídeo	2,5µL de brometo de etídeo
<300	2%	2g agarose	1g agarose
		100mL TBE 1x	50mL TBE 1x
		5µL de brometo de etídeo	2,5µL de brometo de etídeo

Para a preparação dos géis utilizou-se o tampão TBE 1x preparado a partir da solução stock de TBE 5x (composto por: 54g/L Tris, 27,5g/L ácido bórico e 20mL EDTA 0,5M com pH 8). Relativamente ao brometo de etídeo (BrEt), foi utilizado com uma concentração final de 0,5µg/mL. Dependendo do número de amostras para amplificar, o tamanho do gel a preparar e o número de poços vais variar, e consequentemente, a quantidade de agarose também varia (Tabela 10).

Primeiro, pesou-se a agarose com o auxílio de um pequeno papel de alumínio. De seguida colocou-se a agarose num balão de Erlenmeyer com o volume necessário de tampão TBE 1x. Enquanto a mistura aquecia, para que ocorra a dissolução da agarose, preparou-se um suporte de gel. Depois de aquecida a mistura adicionou-se, com o auxílio de uma micropipeta, a quantidade necessária de brometo de etídeo e misturou-se bem. Por fim, verteu-se esta solução final ainda líquida num suporte com um pente para formar os poços, e aguardou-se que o gel solidificasse.

2. Inserção dos produtos de PCR: após a secagem e solidificação do gel, retirou-se o pente. Com o auxílio de uma micropipeta, colocaram-se pequenas gotas de cerca de 2µL de tampão de carga (10% sacarose, 0,0025% de bromofenol em TE [10mM Tris, 1mM EDTA pH8]) numa porção de PARAFILM® iguais ao número de amostras a serem analisadas. Com outra micropipeta, juntaram-se 10µL do produto de PCR com os 2µL de tampão de carga, misturou-se bem e colocou-se no poço respectivo. É importante referir que no primeiro poço de cada gel depositou-se um marcador de peso molecular e no último colocou-se um controlo positivo, sempre com um poço de intervalo para os produtos de PCR a analisar.

A electroforese foi realizada a 96 Volts, durande 45 minutos, numa tina de electroforese com tampão TBE e a corrida deve ser sempre feita na direcção do eléctrodo negativo, onde estão os poços com os produtos de PCR, para o eléctrodo positivo.

3. Visualização do gel: visualizou-se a presença ou ausência dos amplicões no gel, através de luz ultravioleta (UV), utilizando um transiluminador e fotografou-se, utilizando um capturador de imagem, ChemiGenius (GenSnap, SynGene). Nesta fase é importante e aconselhável a utilização de luvas descartáveis de nitrilo, devido à utilização de brometo de etídeo, que é considerado um reagente carcinogénico.

3.4 Sequenciação

Após visualização dos produtos de PCR através da electroforese em gel de agarose, no caso da tipificação por MLST, foi necessário fazer sequenciação para identificar com precisão as sequências tipo (ST) e em alguns produtos de PBRT também foi necessário realizar sequenciação. A sequenciação automática foi realizada pelo sistema ABI Prism 3730xl ADN Analyser (Thermo Fisher Scientific), através do serviço de uma empresa especializada (Beckman Coulter Genomics, Reino Unido).

As recomendações para a preparação das amostras, relativamente aos volumes e concentrações, podem ser observadas na Tabela 11. A empresa recomenda ainda o envio das amostras e dos *primers* respectivos em *microtubos* de 1,5mL, devidamente identificados com um código fornecido pela empresa, à temperatura ambiente e se possível num envelope almofadado, para que os *microtubos* não sofram qualquer dano.

Tabela 11 Recomendações da empresa *Beckman Coulter Genomics* para a preparação e envio de amostras de ADN para sequenciar

Amostra	Preparação	Volume (mínimo)	Concentração
Primers	▪ entre 18 e 25pb; ▪ GC% entre 40 e 60; ▪ $50ºC < T_m < 75ºC$.	10µL (até 8 reacções)	▪ 5µM
Produto de PCR **(não purificado)**	▪ verificar amplificação de uma banda apenas através de electroforese.	30µL (até 3 sequenciações) +5µL (por sequenciação extra)	▪ depende dos amplicões (x) ▪ x < 1000pb: 30ng/ µL ▪ 1000 < x < 2000: 60ng/ µL ▪ 2000 < x < 3000: 90ng/ µL ▪ evitar tampão TE
Produto de PCR **(purificado)**	▪ verificar amplificação de uma banda apenas através de electroforese; ▪ pode-se escolher a opção PUR durante o pedido, que obriga a empresa a fazer a purificação.	15µL (até 3 sequenciações) +5µL (por sequenciação extra)	▪ depende dos amplicões (x) ▪ x < 1000pb: 15ng/ µL ▪ 1000 < x < 2000: 25ng/ µL ▪ 2000 < x < 3000: 35ng/ µL ▪ evitar tampão TE

O método de sequenciação utilizado pela empresa Beckman Coulter Genomics é o método de Sanger, ou didesóxi, que se baseia no processo de replicação em que o produto de

PCR a ser sequenciado é utilizado como molde para criar várias moléculas semelhantes de ADN. Utilizando esta técnica e o equipamente tecnológico avançado de sequenciação, é possível fazer a leitura de milhares de pares de bases em apenas algumas horas, com recurso a corantes fluorescentes e *scanners* a *laser:*

1. marcação dos nucleotídeos de sequenciação com corantes fluorescenters diferentes para cada um;

2. electroforese em tubos capilares contendo o gel;

3. os fragmentos de ADN, de diferentes tamanhos, vão-se separando ao longo do capilar e vão migrando, passando por um feixe de *laser* e um detector;

4. quando os fragmentos passam pelo feixe de *laser*, os corantes são activados, emitindo uma fluorescência de comprimento de onda característico, que é analisado pelo *scanner* óptico;

5. essa informação é depois processada por um computador e pode ser analisada através da leitura de picos de comprimento de onda num gráfico (Figura 13).

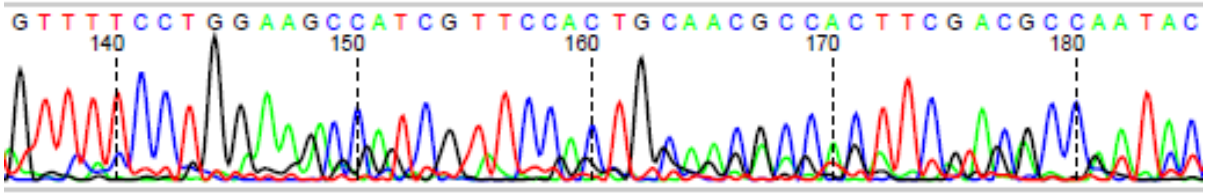


Figura 13 Gráfico com picos de comprimento de onda da fluorescência numa amostra de ADN para estudo dos plasmídeos através de PBRT.

No caso dos produtos de PCR enviados para sequenciar durante o desenvolvimento deste estudo, a quantidade de produto de PCR enviada foi de 40µL e a de *primer* foi de 20µL, ambos colocados em *microtubos* de 1,5mL.

Após a sequenciação, foi necessário realizar a análise das sequências obtidas. Para tal foram utilizadas várias ferramentas informáticas, para o tratamento e análise das sequências. Primeiro, foi feita a análise do gráfico com os picos de comprimento de onda da fluorescência, que devem ser altos e únicos. De seguida, foi feito o tratamento da sequência em formato FASTA através do *Nucleic Acid Sequence Massager*, retirando os espaços entre

nucleotídeos do formato FASTA (www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm). Depois, foi feita uma comparação das sequências no Clustal W2, utilizado para alinhamentos de sequência múltiplos (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) e no EMBOSS *Pairwise Alignment Tool* (www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/). Para determinar as sequências tipo (ST) de alguns isolados foi ainda utilizada a base de dados MLST *Database*, da Universidade de Warwick (Coventry, Inglaterra) (mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli).

3.5 Electroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A diversidade clonal e as possíveis relações clonais entre os vários isolados de *Escherichia coli* produtores de beta-lactamases de espectro largo foram estudadas através de electroforese em campo pulsado (PFGE-"Pulsed Field Gel Electrophoresis"). Foi seguido o protocolo proposto por Gautom et al., em 1997, com ligeiras alterações (Gautom 1997), como se explica:

1. Preparação dos insertos: a partir de uma cultura pura em meio de BHI-agar, com o auxílio de uma ansa, colocou-se uma colónia em suspensão em 1mL de tampão SE (75mM NaCl; 25mM EDTA, pH 8) até se atingir uma absorvância de 1,35 a 610nm. A medição do branco de calibração realizou-se com tampão SE.

Preparou-se a agarose (BioRad) a 1,5% em tampão TE (10mM Tris; 1mM EDTA) e manteve-se em agitação a 54ºC. De seguida, com o auxílio de duas micropipetas, misturou-se 0,5mL da suspensão bacteriana com 0,5mL de agarose e repartiu-se pelos moldes. Prepararam-se três insertos por cada isolado de *E.coli*. Deixou-se solidificar entre 5 a 10 minutos no frigorífico. Neste fase é importante desenhar um esquema em papel para identificar o isolado de cada molde.

2. Proteólise bacteriana: com o auxílio de uma pipeta volumétrica, adicionou-se 3mL de tampão de proteólise (50mM Tris; 50mM EDTA; 1% sarcosil; 0,1mg/mL proteinase K, pH 8) em tubos *falcon* de plástico, esterilizados. A proteinase K só deve ser colocado no tampão de proteólise no exacto momento da sua utilização De seguida foram colocados, com o auxílio de uma espátula pequena, os insertos nos tubos devidamente identificados. Incubou-se os tubos *falcon* com os insertos em Banho-Maria a 54ºC, com agitação, durante 24 horas.

3. Lavagem dos insertos: depois de eliminiar o tampão de proteólise, fizeram-se em Banho-Maria a 54ºC as seguintes lavagens, com o auxílio de uma pequena espátula, um balão de Erlenmeyer e um coador:

a) 10mL de água destilada a cada 10 minutos, três vezes, num banho a 54ºC.

b) 10mL de tampão TE a cada 10 minutos, duas vezes, num banho a 54ºC.

c) 10mL de tampão TE à temperatura ambiente.

Os insertos foram então guardados em câmara fria a 4ºC,em tubos *falcon* em tampão TE, podendo ser utilizados até o máximo de um ano após este passo.

4. Digestão enzimática: de cada isolado, com o auxílio de uma pequena espátula, retirou-se um inserto no qual foi utilizada a enzima de restrição *Xba*I. O volume final de tampão de digestão por cada tubo foi de 100µL ao qual se juntou 40U da enzima *Xba*I (NewEngland, Biolabs), BSA a 0,01% e o volume necessário de Tampão 10x de enzima e água destilada esterilizada. Esta etapa deve geralmente ser feita nas últimas horas de trabalho do dia e deve-se ter em atenção o número de amostras que cabem no gel de PFGE. Após esta etapa, os tubos foram incubados durante 6 horas, em Banho-Maria a 37ºC.

5. Preparação do gel de agarose: preparou-se um volume final de 150mL de gel de agarose (BioRad) a 1% em Tampão TBE 0,5x. Verteu-se a agarose fundida no molde para fazer o gel, onde se colocou o pente correspondente e deixou-se solidificar à temperatura ambiente durante cerca de 20 minutos. A restante agarose que não foi utilizada deve ser colocada em Banho-Maria a 50ºC. Encheram-se os poços com os insertos, com o auxílio de uma espátula, colocando no primeiro e último poço o marcador de peso molecular (NewEngland, Biolabs). Deve-se, por fim, empurrar bem os insertos dentro do poço para que não formem bolhas nos poços e depois selar os poços com a agarose mantida em Banho-Maria a 50ºC.

6. Electroforese: colocou-se numa tina de electroforese em campo pulsado CHEF-DR II (BioRad), dois litros de tampão de electroforese com TBE 0,5x suplementado com tioureia 75µM. Relativamente às condições de electroforese, utilizou-se como gradiente de voltagem 6V/cm, manteve-se um pulso de 1 a 30 segundos, durante 23 horas a uma temperatura de 14ºC e uma velocidade da bomba de refrigeração de 70.

7. Coloração do gel e visualização: desligaram-se as máquinas, retirou-se o gel e colocou-se numa solução aquosa de 200mL de brometo de etídio (10µL/200mL) durante cerca de 10 minutos, sempre em agitação. Realizaram-se entre três e quatro lavagens com água miliQ, entre as quais o gel era visualizado no transiluminador ultravioleta. Após as lavagens necessárias, o gel foi visualizado e fotografado com o auxílio de um transiluminador ultravioleta e de um captador de imagens. É importante a lavagem da tina de electroforese em campo pulsado após a sua utilização com água miliQ, fazendo a água correr durante um determinado período de tempo.

8. Análise dos padrões de PFGE: os padrões obtidos foram primeiro analisados e classificados em indistinguíveis, aproximadamente relacionados, possivelmente relacionados e não relacionados, consoante o número de bandas diferentes entre os padrões (Tenover *et al.* 1995). Posteriormente, a construção de dendrogramas e a comparação dos vários clones de *Escherichia coli* foi realizada com o auxílio do *software* computacional, GelCompar (Applied Math), baseado no coeficiente de semelhança de Sørensen-Dice.

3.6 Cálculo da Concentração Mínima Inibitória (CMI) para Selecção de Estirpes Dadoras

Para desenvolver o protocolo de conjugação, foi necessário previamente realizar a medição da concentração mínima inibitória (CMI) à rifampicina, dos isolados seleccionados com diferente padrão de PFGE, diferente origem e diferente tipo de ESBL. O protocolo utilizado para a avaliação da CMI dos isolados à rifampicina correspondeu a um processo moroso e que requereu alguns cuidados especiais, tendo primeiro sido preparadas as placas com meio de cultura Muller-Hinton com diferentes diluições e concentrações de rifampicina, e seguindo as directrizes CLSI (CLSI 2014):

1. Foram criadas sete diluições seriadas (1:2) de uma solução de rifampicina (2mg/mL; 1mg/mL; 500µg/mL; 250µg/mL; 125µg/mL; 62,5µg/mL; 31,25µg/mL). Para trabalhar com este antibiótico é necessário ter alguns cuidados, pois, para além de ser sensível à luz, deve-se fazer a sua diluição em metanol. Assim sendo, cada passo do protocolo que implicasse o contacto com a rifampicina, foi realizado com a menor quantidade de luz possível.

O primeiro passo foi a criação de uma solução *stock* com com concentração de 2mg/mL, para tal foram dissolvidos 6mg de rifampicina em pó (Sigma Aldrich) no mínimo volume de metanol (cerca de 500µL), e depois completou-se o volume com água destilada esterilizada até perfazer 3mL de volume total, tudo isto num tubo *falcon* de plástico.

2. De seguida, colocaram-se 1,5mL de água esterilizada em seis tubos *falcon* de plástico. Com o auxílio de uma micropipeta, foram retirados 1,5mL da solução *stock* e foram colocados no primeiro tubo *falcon* (que ficou com concentração de 1mg/mL), do primeiro *falcon* foi retirado 1,5mL e foram colocados no segundo tubo *falcon* (que ficou com concentração de 500µg/mL), e assim sucessivamente até ficarem sete tubos *falcon* com sete diluições seriadas (1:2), todos devidamente identificados. O tubo *falcon* com a solução stock de rifampicina, de cor alaranjada forte, foi revestido com papel de alumínio para evitar o contacto com a luz.

3. Após a preparação das diluições, foi preparado o meio de cultura Muller-Hinton agar. Foram preparadas sete placas com aproximadamente 19mL de meio de cultura Muller-Hinton às quais foi adicionado 1mL de cada diluição, com o auxílio de uma micropipeta. Placas apenas com meio de cultura Muller-Hinton agar e sem antibiótico foram também preparadas de forma a funcionarem como controlo de crescimento. Todas as placas foram devidamente identificadas com a concentração de antibiótico, 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12µg/mL, 6µg/mL, 3µg/mL e 1,5µg/mL respectivamente. É importante referir que todas elas foram revestidas com papel de alumínio, para evitar a degradação do antibiótico através do contacto com a luz.

Com todas as diluições seriadas de rifampicina preparadas em meio de cultura Muller-Hinton, foi necessário passar à próxima fase, a inoculação das placas preparadas previamente. Esta fase requereu a utilização de esquipamento específico, que foi um inoculador múltiplo ou replicador de Steers (Figura 14). Assim sendo, o processo de inoculação dos isolados decorreu através dos seguintes passos:

1. Preparam-se dois conjuntos de tubos de ensaio com 3mL de solução salina esterilizada (NaCl a 0,9%);

2. Semearam-se os isolados puros, preservados em meio de leite, em placas com meio BHI-agar, devidamente identificadas, e incubaram-se durante 24 horas a 37ºC numa estufa;

3. Após as 24 horas de incubação, foram repicadas duas a três colónias para a primeira série de tubos com 3mL de solução salina, com o auxílio de uma ansa, até se obter uma turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland (de 0,5 a 10) (McFarland 1907);

4. Transferiram-se 500µL da solução preparada no passo anterior, com o auxílio de uma micropipeta, para a segunda série de tubos com 3mL de solução salina. Agitaram-se os tubos vigorosamente no vórtex para homogeneizar a solução;

5. Com o auxílio de uma micropipeta, transferiram-se 500µL de cada tubo da última série de solução preparada, para cada poço do aparelho de replicação múltipla de Steers (Figura 14);

6. Começando na placa com menor concentração de rifampicina e subindo na concentração até à de maior concentração, foram inoculadas as amostras, pressionando as agulhas do replicador de Steers primeiro nos poços e depois nas placas. É importante certificar que todas as agulhas entram em contacto com as placas, assim como inocular uma placa controlo (sem rifampicina) antes e depois das placas com antibiótico;

7. As placas inoculadas foram incubadas em estufa a 37ºC durante 24 horas;

8. Após as 24 horas de incubação, foi analisada a concentração mínima inibitória para cada estirpe, que correspondeu à concentração mais baixa que inibia o crescimento bacteriano.

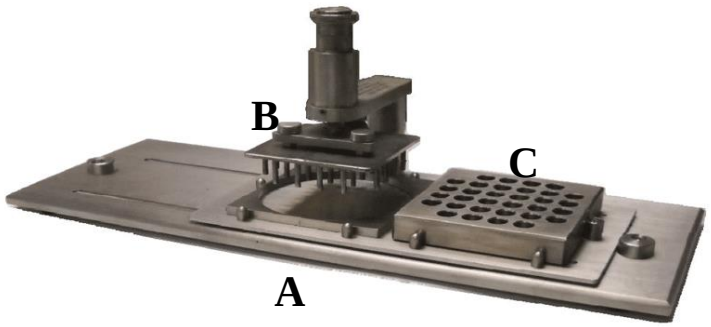


Figura 14 Replicador de Steers ou inoculador múltiplo, utilizado durante o protocolo para análise da concentração mínima inibitória (CMI)

A-local de colocação da placa com meio de cultura; B-agulhas de inoculação; C-poços com as amostras a inocular.

Esta experiência, juntamente com a electroforese em campo pulsado (PFGE), permitiu fazer uma selecção mais reduzida, mas de igual interesse amostral, para realizar o protocolo

de conjugação. Através de PFGE foi possível detectar a semelhança de alguns clones e reduzir a amostragem e, através do estudo da CMI, foram seleccionados os isolados com maior sensibilidade à rifampicina. Esta selecção foi realizada para eleger as estirpes dadoras para o processo de conjugação.

3.7 Transferência de Genes de Resistência Através de Conjugação

A transferência de ADN entre células bacterianas pode ocorrer de três formas distintas: transformação, transdução e conjugação. Esta última, utilizada durante o desenvolvimento deste estudo, implica uma grande proximidade entre células bacterianas, até que criem uma conexão entre elas, chamada ponte citoplasmática. Através dessa ligação, ocorre transferência de material genético de uma célula dadora para uma células receptora. Após esta troca de material genético, ocorre *crossing over* entre sequências homólogas do ADN transferido e o ADN da células receptora. É ainda importante referir que, durante este processo de conjugação, a transferência de material genético ocorre unidireccionalmente, da célula dadora para a célula receptora, sem troca recíproca (Pierce 2002).

Baseando-se neste conceito teórico, desenvolveu-se um protocolo experimental para a transferência horizontal de genes de resistência entre estirpes bacterianas de *Escherichia coli*. A conjugação bacteriana foi realizada em meio líquido com meio de cultura Luria Bertani (LB). Primeiro, foi seleccionada uma estirpe receptora, que foi a *Escherichia coli* CSH26, resistente à rifampicina, sem plasmídeos e negativa relativamente à lactose. Depois, o seguinte protocolo foi aplicado:

1. Inocularam-se as estirpes seleccionadas como dadoras em tubos de ensaio com 5mL de meio de cultura BHI líquido. A estirpe seleccionada como receptora foi inoculada num pequeno balão de Erlenmeyer com 20mL do mesmo meio de cultura. Ambos os inóculos foram incubados em estufa a 37ºC durante 24 horas;

2. Após as 24 horas de incubação, e com o auxílio de micropipeta, misturaram-se 250µL de cada estirpe dadora com 1mL de estirpe receptora em pequenos Erlenmeyers com 20mL de meio nutritivo Luria Bertani. Devidamente identificados, os balões de Erlenmeyer

com as misturas preparadas, foram incubados a 37ºC, durante 24 horas em plataforma de agitação;

3. Posteriormente, cada mistura foi inoculada em três placas distintas com meio de agar MacConkey: uma suplementada com Rif_{50} (50µg/mL de rifampicina), uma suplementada com CTX_5 (5µg/mL de cefotaxima) e uma suplementada com Rif_{50} e CTX_5 (50µg/mL de rifampicina + 5µg/mL de cefotaxima);

4. Por fim, as placas foram incubadas a 37ºC durante 24 horas e posteriormente foi feita a análise e contagem do transconjugantes.

Ao fazer a contagem dos transconjugantes (TC) seguiram-se as seguintes premissas: na placa com agar MacConkey suplementada apenas com Rif_{50} só deviam crescer as estirpes receptoras e os TC; na placa suplementada apenas com CTX_5 só deviam crescer as estirpes dadoras e os TC; e nas placas suplementadas com ambos os antibióticos deviam crescer apenas os transconjugantes. Os transconjugantes deveriam ser facilmente identificáveis pela sua transparência, pois têm de ser negativos relativamente à fermentação da lactose (Lac^-). A contagem das colónias bacterianas foi facilitada pela divisão das placas com agar MacConkey em quatro quadrantes.

3.8 Tipificação de Plasmídeos Através de PCR (PBRT-"PCR-*based replicon typing*")

Devido à importância e às diferentes características desta reacção de PCR, foi necessário criar uma sub-divisão apenas para ela. O facto de um dos objectivos principais desta dissertação ser o estudo e diversidade dos plasmídeos em *Escherichia coli*, requer que a identificação dos mesmos através de PCR mereça um especial enfoque.

O protocolo utilizado para a identificação de plasmídeos através de "PCR-*based replicon typing*" (PBRT) foi descrito por Alessandra Carattoli em 2005 (Carattoli *et al.* 2005). Este método implica a amplificação de replicões da maioria dos grupos de incompatibilidade (Inc) de plasmídeos em Enterobactérias como *Escherichia coli.* O protocolo desenvolvido por Carattoli consiste em cinco *multiplex* e três reacções de PCR simples, tudo isto com o auxílio de 18 pares de *primers* que permitem o reconhecimento dos replicões. Em cada mini

microtubo utilizado para a reacção de PCR foram inseridos 25µL de volume final, incluindo a amostra de ADN e todos os componentes essenciais para uma reacção de PCR (Tabela 12).

Tabela 12 Volumes e concentrações dos reagentes usados nas reacções de PBRT (Adaptado de Vinué, 2010)

Componentes	**Concentração inicial**	**Volume (por tubo)**
Primer forward	50µM	0,5µL
Primer reverse	50µM	0,5µL
BIOTAQ^{TM} ADN polimerase (Bioline)	5U/µL	0,25µL
Tampão de reacção NH_4 + $MgCl_2$ (Bioline)	10x	2,5µL
dNTPs	10mM	0,5µL
ADN	-	2µL
Água miliQ esterilizada	-	Até perfazer 25µL

No caso das reacções de PCR *multiplex*, adicionaram-se três pares de *primers* e reduziu-se a quantidade de água miliQ esterilizada. Em todas as reacções de PCR foram incluídos controlos positivos para cada grupo de incompatibilidade (HI1, HI2, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIs, F_{repB}, K, B/O), gentilmente cedidos pela Universidade de La Rioja (UR), e um controlo negativo, com água miliQ esterilizada em substituição da amostra de ADN. As tabelas seguidamente apresentadas mostram os *primers* utilizados para cada reacção de PCR, bem como as condições de amplificação. As Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17 são referentes às reacções de PCR *multiplex*, enquanto que a Tabela 18 diz respeito aos *primers* e condições utilizadas nas reacções de PCR simples (Carattoli *et al.* 2005)

Tabela 13 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 1 para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al*., 2005)

***Primers* utilizados**	**Produto de PCR (pb)**	**Sequência dos *primer*s (5'→3')**	**Condições de amplificação**
HI1	471	GGA GCG ATG GAT TAC TTC AGT AC TGC CGT TTC ACC TCG TGA GTA	94ºC, 5', 1 ciclo 94ºC, 1' 60ºC, 30'' } 30 ciclos 72ºC, 1' 72ºC, 5', 1 ciclo
HI2	644	TTT CTC CTG AGT CAC CTG TTA ACA C GGC TCA CTA CCG TTG TCA TCC T	
I1	139	CGA AAG CCG GAC GGC AGA A TCG TCG TTC CGC CAA GTT CGT	

Tabela 14 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 2 para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al*., 2005)

***Primers* utilizados**	**Produto de PCR (pb)**	**Sequência dos *primer*s (5'→3')**	**Condições de amplificação**
X	376	AAC CTT AGA GGC TAT TTA AGT TGC TGA T	94ºC, 5', 1 ciclo
		TGA GAG TCA ATT TTT ATC TCA TGT TTT AGC	94ºC, 1'
L/M	785	GGA TGA AAA CTA TCA GCA TCT GAA G	60ºC, 30'' } 30 ciclos
		CTG CAG GGG CGA TTC TTT AGG	72ºC, 1'
N	559	GTC TAA CGA GCT TAC CGA AG	72ºC, 5', 1 ciclo
		GTT TCA ACT CTG CCA AGT TC	

Tabela 15 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 3 para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al*., 2005)

***Primers* utilizados**	**Produto de PCR (pb)**	**Sequência dos *primer*s (5'→3')**	**Condições de amplificação**
FIA	462	CCA TGC TGG TTC TAG AGA AGG TG	94ºC, 5', 1 ciclo
		GTA TAT CCT TAC TGG CTT CCG CAG	94ºC, 1'
FIB	702	GGA GTT CTG ACA CAC GAT TTT CTG	60ºC, 30'' } 30 ciclos
		CTC CCG TCG CTT CAG GGC ATT	72ºC, 1'
W	242	CCT AAG AAC AAC AAA GCC CCC G	72ºC, 5', 1 ciclo
		GGT GCG CGG CAT AGA ACC GT	

Tabela 16 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 4 para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al*., 2005)

***Primers* utilizados**	**Produto de PCR (pb)**	**Sequência dos *primer*s (5'→3')**	**Condições de amplificação**
Y	765	AAT TCA AAC AAC ACT GTG CAG CCT G	94ºC, 5', 1 ciclo
		GCG AGA ATG GAC GAT TAC AAA ACT TT	94ºC, 1'
P	534	CTA TGG CCC TGC AAA CGC GCC AGA AA	60ºC, 30'' } 30 ciclos
		TCA CGC GCC AGG GCG CAG CC	72ºC, 1'
FIC	262	GTG AAC TGG CAG ATG AGG AAG G	72ºC, 5', 1 ciclo
		TTC TCC TCG TCG CCA AAC TAG AT	

Tabela 17 Sequências nucleotídicas dos primers da PCR *multiplex* número 5 para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al*., 2005)

***Primers* utilizados**	**Produto de PCR (pb)**	**Sequência dos *primer*s (5'→3')**	**Condições de amplificação**
A/C	465	GAG AAC CAA AGA CAA AGA CCT GGA	94ºC, 5', 1 ciclo
		ACG ACA AAC CTG AAT TGC CTC CTT	94ºC, 1'
T	750	TTG GCC TGT TTG TGC CTA AAC CAT	60ºC, 30'' } 30 ciclos
		CGT TGA TTA CAC TTA GCT TTG GAC	72ºC, 1'
FIIs	270	CTG TCG TAA GCT GAT GGC	72ºC, 5', 1 ciclo
		CTC TGC CAC AAA CTT CAG C	

Tabela 18 Sequências nucleotídicas dos primers das três reacções de PCR simples para o estudo de plasmídeos e respectivas condições de amplificação (Adaptado de Carattoli *et al*., 2005)

***Primers* utilizados**	**Produto de PCR (pb)**	**Sequência dos *primer*s (5'→3')**	**Condições de amplificação**
B/O	159	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C	94ºC, 5', 1 ciclo
		TCT GCG TTC CGC CAA GTT CGA	94ºC, 1'
K	160	GCG GTC CGG AAA GCC AGA AAA C	60ºC, 30'' } 30 ciclos
		TCT TTC ACG AGC CCG CCA AA	72ºC, 1'
			72ºC, 5', 1 ciclo
F_{repB}	270	TGA TCG TTT AAG GAA TTT TG	94ºC, 5', 1 ciclo
		GAA GAT CAG TCA CAC CAT CC	94ºC, 1'
			52ºC, 30'' } 30 ciclos
			72ºC, 1'
			72ºC, 5', 1 ciclo

Resultados

“If you’re walking down the right path and you’re willing to keep walking, eventually you’ll make progress”

- Barack Obama -

Capítulo 4 – Resultados

4.1 Selecção dos Isolados [primeira fase]

A primeira fase do estudo consistiu na selecção dos isolados a utlizar. Inicialmente foi proposta a análise de 53 isolados de *Escherichia coli* de sete estudos diferentes (Costa *et al.* 2006; Goncalves *et al.* 2012a; Goncalves *et al.* 2012b; Poeta *et al.* 2009; Radhouani *et al.* 2013a; Silva *et al.* 2011; Sousa *et al.* 2011) (Figura 15).

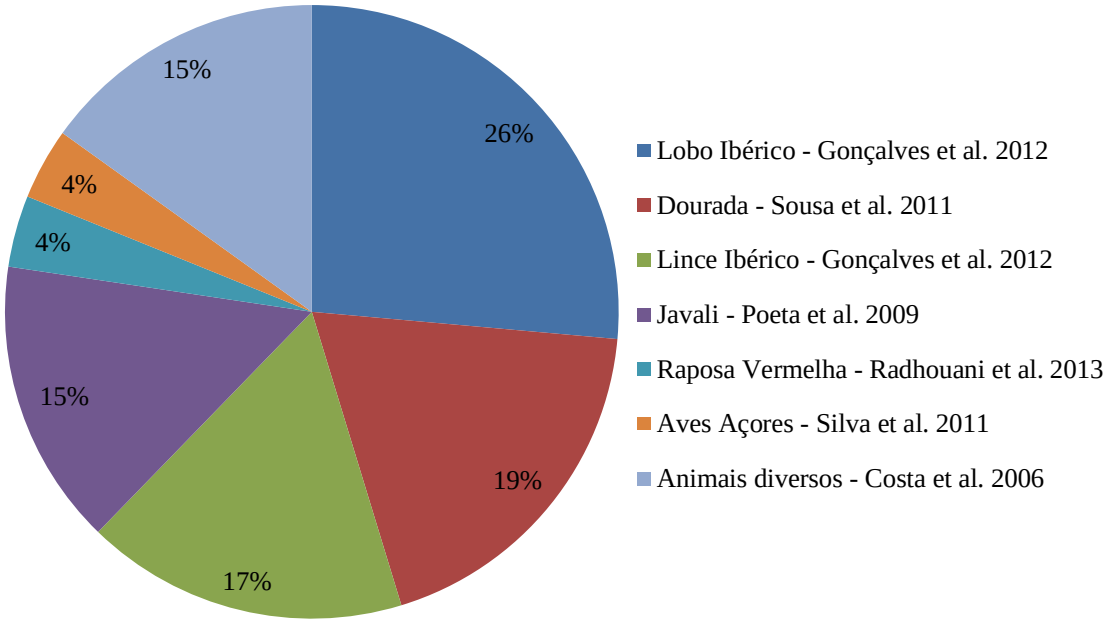


Figura 15 Divisão dos 53 isolados por número (%), espécie de animal e por estudo

A selecção de isolados foi novamente testada relativamente à susceptibilidade aos antibióticos e ao fenótipo produtor de β-lactamases de largo espectro, para verificar se mantinham o seu fenótipo de resistência previamente identificado. Assim sendo, nas tabelas seguintes estão descritos os fenótipos de resistência dos 53 isolados de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro incluídas inicialmente neste estudo, divididas pelos estudos de origem.

Tabela 19 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de diferentes espécies de animais selvagens incluídas neste estudo (Adaptado de Costa *et al.*, 2006)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C1417	Veado	Portugal	SXT[I]	TEM-52
C1418	Veado	Portugal	Susceptível	TEM-52
C1419	Coruja	Portugal	Susceptível	TEM-52
C1420	Ave de rapina	Portugal	NA; TE	CTX-M-14 + TEM-52
C1421	Raposa	Portugal	ST; NA; CI; TE	CTX-M-14 + TEM-1
C1422	Ave de rapina	Portugal	ST; SXT; NA; CI; TE; GE	CTX-M-14 + TEM-1
C1423	Ave de rapina	Portugal	ST; SXT; NA; TE	CTX-M-14 + TEM[b]
C1425	Ave de rapina	Portugal	ST; SXT; NA; TE; GE; TB	SHV-12

a NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

bDurante o estudo a reacção de PCR determinou mais do um gene bla_{TEM} neste isolado

Tabela 20 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de javalis selvagens incluídas neste estudo (Adaptado de Poeta *et al.*, 2009)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C1732	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT; NA; TE; ST	CTX-M-1 + TEM-1-b
C1733	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT	CTX-M-1
C1734	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT; NA; ST, CHL	CTX-M-1
C1735	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT	CTX-M-1
C1737	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT; NA	CTX-M-1
C1738	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT; NA; CI; TE	CTX-M-1 + TEM-1-b
C1739	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT; TE	CTX-M-1
C1740	Javali (*Sus scrofa scrofa* L.)	Portugal	SXT; NA; CI; TE	CTX-M-1

a NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

Tabela 21 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de douradas incluídas neste estudo (Adaptado de Sousa *et al*., 2011)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C2509	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL	TEM-52
C2510	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL	TEM-52
C2511	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL	SHV-12
C2512	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL	SHV-12
C2513	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL	SHV-12
C2514	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL	SHV-12
C2515	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	SXT; ST; CHL	SHV-12
C2516	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	CHL	SHV-12
C2517	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	Susceptível	TEM-52
C2518	Dourada (*Sparus Aurata*)	Portugal	Susceptível	TEM-52

[a] NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

Tabela 22 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de aves dos Açores incluídas neste estudo (Adaptado de Silva *et al*., 2011)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C6831	Aves Açores (*Sylvia atricapilla*)	Portugal	TE	CTX-M-14 + SHV-12
C6832	Aves Açores (*Sylvia atricapilla*)	Portugal	TE	CTX-M-14 + SHV-12

[a] NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

Tabela 23 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de lobo ibérico incluídas neste estudo (Adaptado de Goncalves *et al*., 2012b)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C3061	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	TE; NA	CTX-M-1
C3063	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	ST; TE	CTX-M-1
C3064	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	Susceptível	CTX-M-1
C3065	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	SXT; TE; ST; CHL; GE; TB	CTX-M-1
C3066	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	TE	CTX-M-14-a
C3067	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	TE; NA; CI	CTX-M-14-a + TEM-1-b
C3068	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	ST; SXT; TE; NA	CTX-M-14-a + TEM-1-b
C3069	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	ST; TE; NA	CTX-M-14-a
C3070	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	ST; TE; CI; NA	CTX-M-14-b
C3071	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	ST; SXT; TE; CI; NA; CHL	CTX-M-14-b + TEM-1-b
C3072	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	ST; TE; NA; CHL	SHV-12
C3073	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	TE	SHV-12 + TEM-1-b
C3074	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	TE	SHV-12 + TEM-1-b
C3075	Lobo Ibérico (*Canis Lupus signatus*)	Portugal	Susceptível	TEM-52

[a] NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

Tabela 24 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de raposa vermelha incluídas neste estudo (Adaptado de Radhouani *et al*., 2013a)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C5478	Raposa Vermelha (*Vulpes vulpes*)	Portugal	ST; SXT; TE; NA; CI; CHL	TEM-1-b + SHV-12
C5482	Raposa Vermelha (*Vulpes vulpes*)	Portugal	ST; SXT; TE; NA; CI; CHL	TEM-1-b + SHV-12

[a] NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

Tabela 25 Fenótipo de resistência dos isolados de *Escherichia coli* produtores de β-lactamases de largo espectro provenientes de lince Ibérico incluídas neste estudo (Adaptado de Goncalves *et al*., 2012a)

Isolado	Animal	Origem	Fenótipo de resistência[a]	β-lactamases detectadas
C3076	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; TE	CTX-M-14-a + TEM-1-b
C3077	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; TE	CTX-M-14-a
C3078	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; TE	CTX-M-14-a
C3079	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; TE; NA; CI	CTX-M-14-a
C3080	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; TE; NA; CI	CTX-M-14-a
C3081	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; SXT; TE; NA; CI	CTX-M-14-a + TEM-1-b
C3082	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; SXT; TE; NA; CI; CHL	TEM-1-b + SHV-12
C3084	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; SXT; NA	SHV-12
C3085	Lince Ibérico (*Lynx pardinus*)	Espanha	ST; SXT; NA	SHV-12

[a] NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

4.1.1 Caracterização genotípica

De forma a avaliar o grau de patogenicidade dos isolados em estudo e para homogeneizar o perfil genético das 53 estirpes em estudo, foi necessário fazer a determinação do grupo filogenético (Costa *et al.* 2006), das quais não existia este registo (Tabela 26). A determinação dos grupos filogenéticos possui um papel fundamental na compreensão da evolução e disseminação das multirresistências aos antibióticos. Os grupos A e B1 estão geralmente associados a estirpes comensais que não provocam infecções extraintestinais, enquanto os grupos B2 e D têm maior probabilidade de ocorrência em casos clínicos.

O estudo dos grupos filogenéticos implicou a realização de três reacções de PCR com três pares distintos de *primers* (*chu*A, *yja*A, *tsp*E4.C2). Dependendo da presença ou ausência destes genes, os oito isolados sem grupo filogenético foram identificados e divididos pelos grupos A (um isolado), B1 (seis isolados) e D (um isolado), como é possível verificar na Tabela 26.

Tabela 26 Determinação do grupo filogenético dos oito isolados de *Escherichia coli* do estudo "Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal" (Adaptado de Costa *et al*., 2006)

Isolado	*chu*A	*yja*A	*tsp*E4.C2	Grupo Filogenético
C1417	-	-	+	**B1**
C1418	-	-	+	**B1**
C1419	-	-	+	**B1**
C1420	-	-	+	**B1**
C1421	+	-	+	**D**
C1422	-	-	-	**A**
C1423	-	-	+	**B1**
C1425	-	-	+	**B1**

Com o grupo filogenético de todos os isolados definido, foi possível separá-las por três grupos distintos: 23 isolados identificados com o grupo filogenético A, 20 isolados do grupo filogenético B1 e 10 isolados pertencentes ao grupo filogenético D (Figura 16), num total de 53 estirpes em estudo.

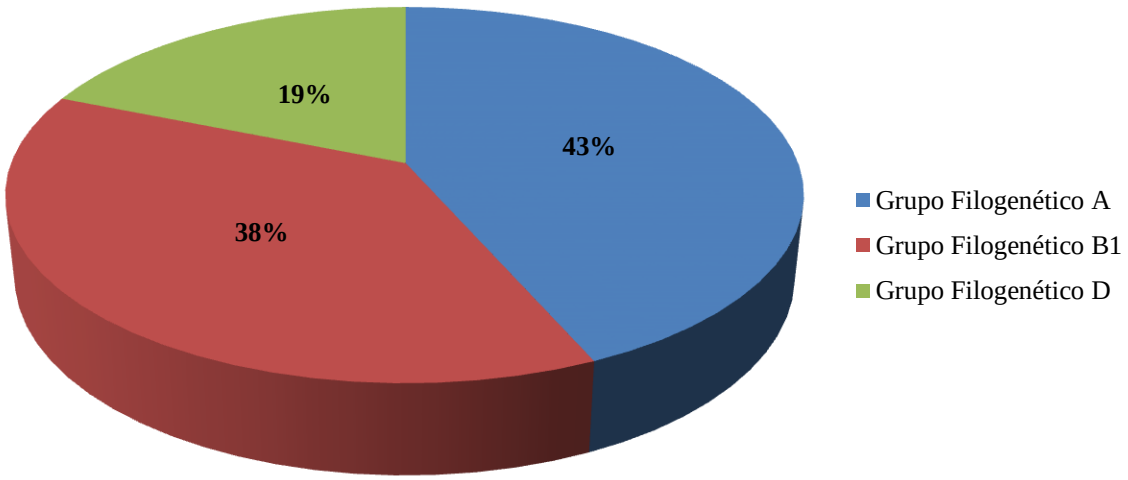


Figura 16 Número de isolados (%) por grupo filogenético

4.2 Electroforese em Campo Pulsado (PFGE) [segunda fase]

Através da análise por electroforese em campo pulsado (PFGE) dos 53 isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL foi possível detectar padrões semelhantes entre os vários clones, assim como fazer uma selecção mais reduzida dos isolados a estudar. Foram realizados três géis devido ao elevado número de amostras e à reduzida capacidade de cada gel (18 insertos por gel). A análise foi realizada com alguma dificuldade devido aos isolados estarem separadas por três géis. Inicialmente os padrões obtido foram analisados consoante o número de bandas diferentes entre eles, segundo as normas criadas por Fred Tenover (Tenover *et al.* 1995). Colocando em prática esta análise foi possível identificar e classificar alguns padrões como indistinguíveis e reduzir o número de estirpes em estudo para 44. Nas três tabelas seguintes é visível a análise de padrões realizada em cada um dos géis de PFGE (Tabela 27, Tabela 28 e Tabela 29), os padrões iguais foram marcados com letras iguais e os isolados marcados a vermelho foram então retirados, para reduzir a selecção de isolados em estudo.

Após a análise visual, foi construído um dendrograma para comparação dos 44 isolados de *Escherichia coli* que se mativeram em estudo. Com o auxílio de um *software* informático, denominado de GelCompar (Applied Math), que se baseia no coeficiente de semelhança de Dice, foi construído o dendrograma que é possível visualizar na Figura 17. Apesar da semelhança clonal dos isolados C1733 e C1737, decidiu-se manter ambos em estudo, devido ao seu grupo filogenético e à sua possível patogenicidade.

Assim sendo, as tabelas foram realizadas após uma análise visual de todos os isolados, separados cada um pelo seu gel, enquanto o dendrograma foi realizado após uma análise computacional. É possível observar no dendrograma alguns isolados que são bastante semelhantes, mas que pelo facto se encontrarem em géis de electroforese distintos e pelo acrescento do olho humano, não foi possível detectar. Podemos observar duas maneiras distintas de análise de padrões de electroforese em campos pulsados nas tabelas e figura que são apresentadas nas páginas seguintes. Este tipo de electroforese foi de grande auxílio nesta segunda fase de selecção e redução do número de isolados, pois facilmente foram detectados clones bacterianos da mesma estirpe de *Escherichia coli* produtora de ESBL.

Tabela 27 Análise dos padrões de PFGE obtidos do primeiro gel de electroforese em campo pulsado

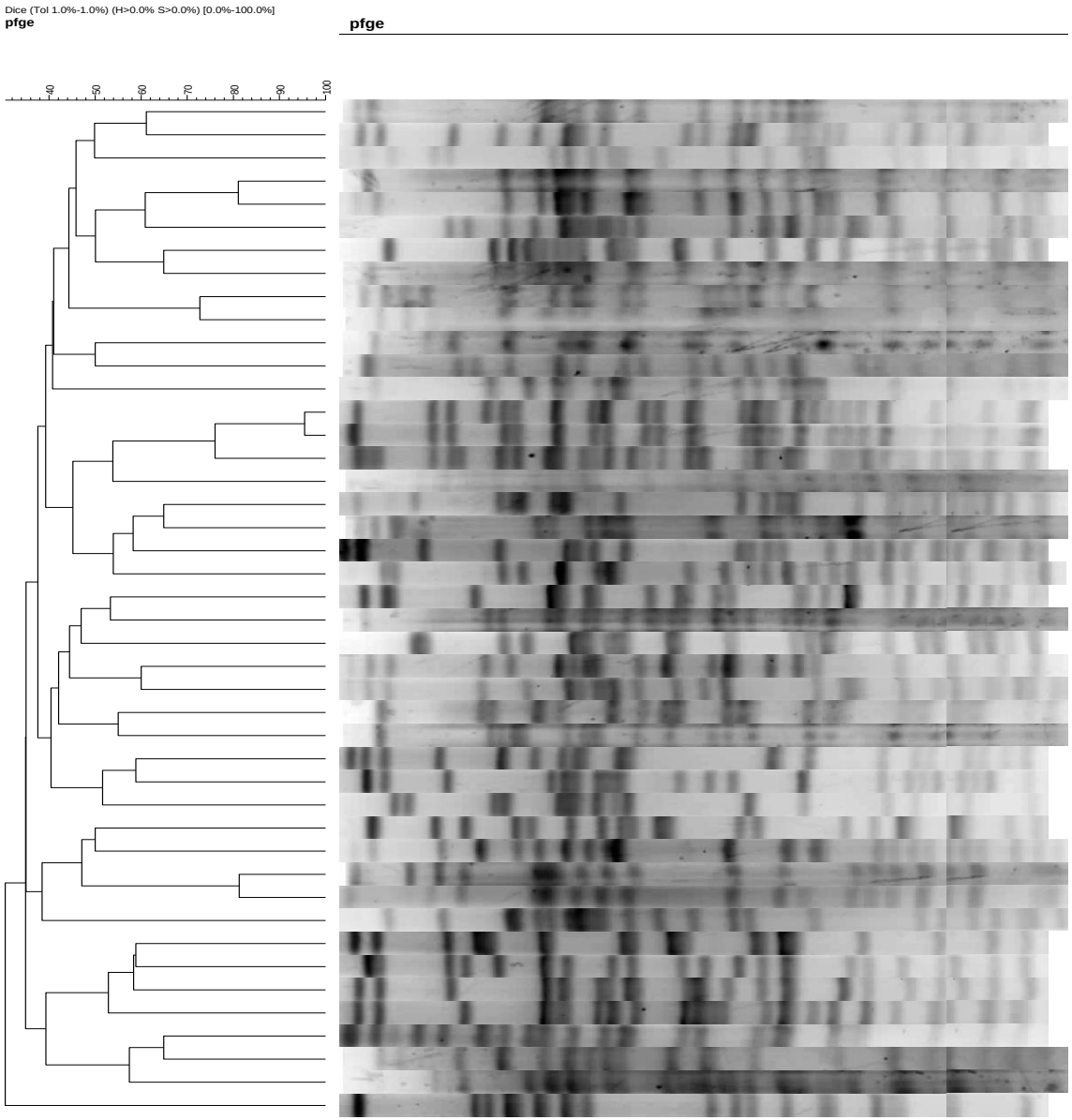
Isolado	**C1421**	**C1733**	**C1737**	**C1740**	**C3065**	**C3068**	**C3069**	**C3071**	**C3080**	**C3085**	**C1417**	**C1418**	**C1419**	**C1420**	**C1423**	**C1425**	**C1734**	**C1735**
Poço	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Padrão PFGE	**A**	**B**	**B1**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**

Tabela 28 Análise dos padrões de PFGE obtidos do segundo gel de electroforese em campo pulsado

Isolado	**C1738**	**C2509**	**C2510**	**C3061**	**C3063**	**C3067**	**C3070**	**C3074**	**C3079**	**C3081**	**C3082**	**C3084**	**C1422**	**C1732**	**C1739**	**C2511**	**C2512**	**C2513**
Poço	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Padrão PFGE	**A**	**B**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**G**	**H**	**I**	**J**	**K**	**L**	**M**	**N**	**N**	**N**

Tabela 29 Análise dos padrões de PFGE obtidos do terceiro gel de electroforese em campo pulsado

Isolado	**C2514**	**C2515**	**C2516**	**C2517**	**C2518**	**C3064**	**C3066**	**C3072**	**C3073**	**C3075**	**C3076**	**C3077**	**C3078**	**C5478**	**C5482**	**C6831**	**C6832**
Poço	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Padrão PFGE	**A**	**B**	**B**	**C**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**D**	**H**	**I**	**I**	**J**	**J**	**K**	**K**



C2509	B1	TEM-52	Dourada
C1423	B1	CTX-M-14	Ave de Rapina
C3064	A	CTX-M-1	Lobo Ibérico
C3074	B1	SHV-12	Lobo Ibérico
C3066	A	CTX-M-14	Lobo Ibérico
C3076	A	CTX-M-14	Lince Ibérico
C1734	B1	CTX-M-1	Javali
C3079	B1	CTX-M-14	Lince Ibérico
C3081	B1	CTX-M-14	Lince Ibérico
C1732	A	CTX-M-1	Javali
C3061	B1	CTX-M-1	Lobo Ibérico
C3084	B1	SHV-12	Lince Ibérico
C2517	A	TEM-52	Dourada
C1733	D	CTX-M-1	Javali
C1737	D	CTX-M-1	Javali
C1740	D	CTX-M-1	Javali
C1739	A	CTX-M-1	Javali
C2515	A	SHV-12	Dourada
C1422	A	CTX-M-14	Ave de Rapina
C3065	D	CTX-M-1	Lobo Ibérico
C6831	A	CTX-M-14 y SHV-12	Ave Açores
C1420	B1	CTX-M-14	Ave de Rapina
C3070	B1	CTX-M-14	Lobo Ibérico
C1735	B1	CTX-M-1	Javali
C3073	A	SHV-12	Lobo Ibérico
C3077	A	CTX-M-14	Lince Ibérico
C1738	B1	CTX-M-1	Javali
C3063	B1	CTX-M-1	Lobo Ibérico
C1418	B1	TEM-52	Veado
C1417	B1	TEM-52	Veado
C1419	B1	TEM-52	Coruja
C1425	B1	SHV-12	Ave de Rapina
C3072	A	SHV-12	Lobo Ibérico
C2511	A	SHV-12	Dourada
C2514	A	SHV-12	Dourada
C5478	A	SHV-12	Raposa Vermelha
C3071	D	CTX-M-14	Lobo Ibérico
C3085	D	SHV-12	Lince Ibérico
C3080	D	CTX-M-14	Lince Ibérico
C3069	D	CTX-M-14	Lobo Ibérico
C1421	D	CTX-M-14	Raposa
C3082	B1	SHV-12	Lince Ibérico
C3067	B1	CTX-M-14	Lobo Ibérico
C3068	D	CTX-M-14	Lobo Ibérico

Figura 17 Dendrograma com os 44 isolados seleccionados após análise dos padrões de electroforese em campos pulsados

4.3 Tipificação de Sequência *Multilocus* (MLST, "*multilocus sequence typing*") e Selecção de Estirpes [terceira fase]

De forma a fazer uma selecção mais criteriosa e abrangente e, ao mesmo tempo, reduzir o número de isolados em estudo, foram definidos três parâmetros de selecção:

a) Os padrões de restrição determinados por electroforese em campo pulsado (PFGE);

b) A origem da amostra, em termos de espécie de proveniência; e

c) O tipo de beta-lactamase de espectro largo.

Assim sendo, após fazer a análise aos 44 isolados previamente seleccionados, foi possível reduzir a população em estudo para 29 isolados de *Escherichia coli* produtoras de ESBL. Com os 29 isolados seleccionados foi possível construir um dendrograma (Figura 18) onde são visíveis e analisáveis as relações clonais através dos padrões de restrição obtidos por electroforese em campo pulsado (PFGE).

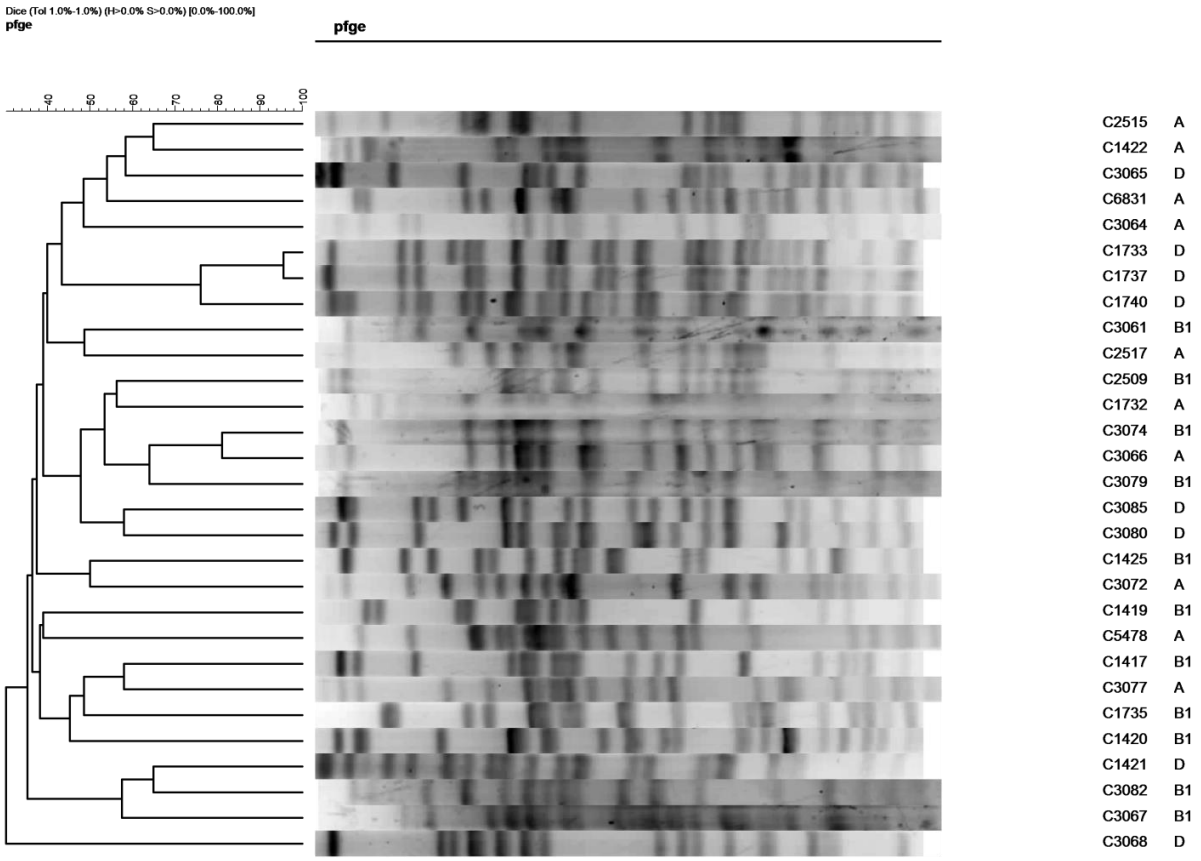


Figura 18 Dendrograma com os 29 isolados seleccionados após análise dos padrões de electroforese em campo pulsado, os diferentes tipos de ESBL e a sua espécie de origem

Apesar da semelhança clonal dos isolados C1733 e C1737, decidiu-se manter ambos em estudo devido ao seu grupo filogenético e à sua possível patogenicidade. Foi possível dividir esta selecção de isolados por três grupos filogenéticos, de forma equitativa, 8 isolados do grupo D, 11 isolados do grupo B1 e 10 isolados do grupo A (Figura 19).

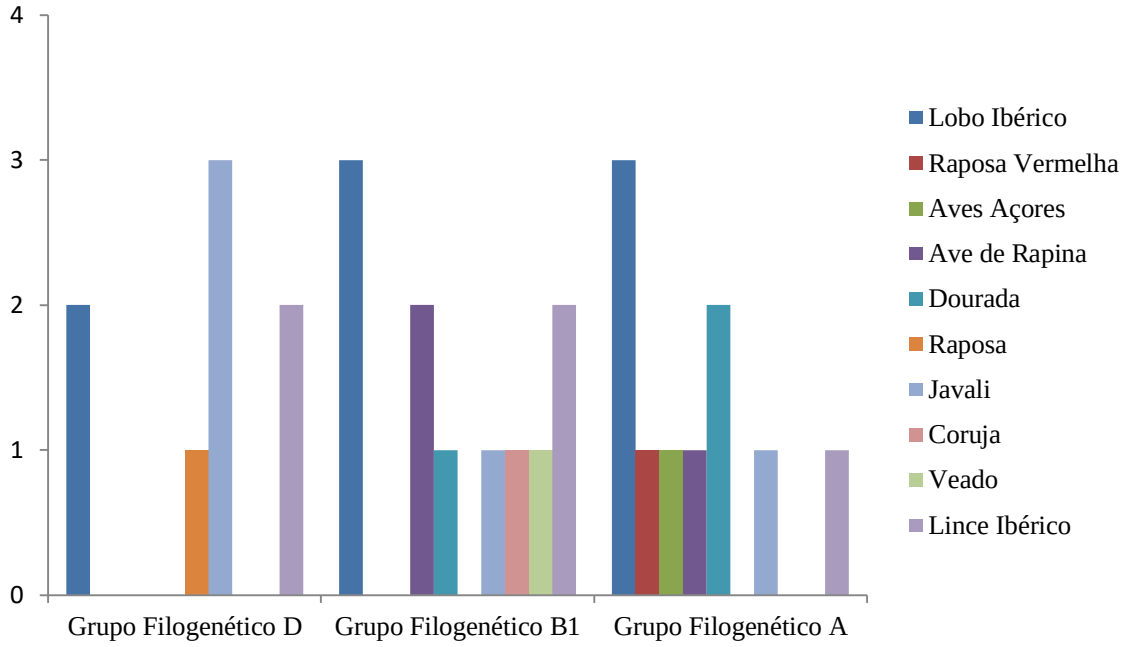


Figura 19 Divisão dos 29 isolados seleccionados, por grupo filogenético e por espécie de origem

Obtivemos assim uma selecção de 29 isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL (Tabela 10). Uma selecção diversificada, com todas as espécies de origem, com distintos tipos de β-lactamases produzidas, das famílias CTX-M, TEM e SHV. Esta redução no número de isolados e a selecção segundo critérios definidos foi realizada com o propósito de possuir um conjunto menos numeroso de isolados, mas mesmo assim representativo do conjunto de partida. Partindo deste conjunto variado de 29 isolados, foi possível, de forma mais simples e célere, eleger os dadores para a próxima fase de conjugação.

Assim sendo, e como é visível na Tabela 30, entre os 29 isolados seleccionados é possível encontrar todas as nove espécies em estudo desde o início (lobo Ibérico, lince Ibérico, dourada, javali, raposa, aves dos Açores, veado, coruja e aves de rapina), com dez combinações diferentes de genes que produzem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{TEM\text{-}52}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}a}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{TEM\text{-}1}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}a}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{TEM\text{-}52}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{SHV\text{-}12}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$).

O conjunto selecionado, com distintos padrões de PFGE, foi dividido pelo respectivo grupo filogenético, permitindo fazer uma separação pelo grau de possível patogenicidade.

Tabela 30 Conjunto de 29 isolados seleccionados na terceira fase, de acordo com o padrão de restrição por PFGE, a espécie de origem e o tipo de ESBL

Grupo Filogenético D			Grupo Filogenético B1			Grupo Filogenético A		
Isolado	**Origem**	**β-lactamases**	**Isolado**	**Origem**	**β-lactamases**	**Isolado**	**Origem**	**β-lactamases**
C1421	Raposa	**CTX-M-14+TEM-1**	C1417	Veado	**TEM-52**	C1422	Ave Rapina	**CTX-M-14+TEM-1**
C1733	Javali	**CTX-M-1**	C1419	Coruja	**TEM-52**	C1732	Javali	**CTX-M-1+TEM-1-b**
C1737	Javali	**CTX-M-1**	C1420	Ave Rapina	**CTX-M-14+TEM-52**	C2515	Dourada	**SHV-12**
C1740	Javali	**CTX-M-1**	C1425	Ave Rapina	**SHV-12**	C2517	Dourada	**TEM-52**
C3065	Lobo Ibérico	**CTX-M-1**	C1735	Javali	**CTX-M-1**	C3064	Lobo Ibérico	**CTX-M-1**
C3068	Lobo Ibérico	**CTX-M-14-a+TEM-1-b**	C2509	Dourada	**TEM-52**	C3066	Lobo Ibérico	**CTX-M-14-a**
C3080	Lince Ibérico	**CTX-M-14-a**	C3061	Lobo Ibérico	**CTX-M-1**	C3072	Lobo Ibérico	**SHV-12**
C3085	Lince Ibérico	**SHV-12**	C3067	Lobo Ibérico	**CTX-M-14-a+TEM-1-b**	C3077	Lince Ibérico	**CTX-M-14-a**
			C3074	Lobo Ibérico	**SHV-12+TEM-1-b**	C5478	Raposa Ver.	**SHV-12+TEM-1-b**
			C3079	Lince Ibérico	**CTX-M-14-a**	C6831	Ave Açores	**CTX-M-14+SHV-12**
			C3082	Lince Ibérico	**SHV-12+TEM-1-b**			

A patogenicidade e os fenótipos altamente virulentos associados às estirpes atribuídas ao grupo filogenético D, levou à necessidade de realizar uma caracterização mais pormenorizada destes isolados. Os oito isolados designados com o grupo filogenético D, previamente seleccionados, foram assim analisados através de MLST de forma a identificar as sequências tipo (ST) e os complexos clonais. Para tal foi necessário analisar sete genes *housekeeping* (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*), que, dependendo da correspondência com sequências de referência e do seu valor, permitiu obter um número identificativo da sequência tipo (ST) dos isolados.

Entre os oito isolados de *Escherichia coli* analisados, todos pertencentes ao grupo filogenético D, foram detectados quatro STs distintos (Tabela 31) através da base de dados MLST *Database* da Universidade de Warwick (Coventry, Inglaterra) (mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli). Mais especificamente, a quatro isolados foi atribuído o ST117, dois isolados foram identificados como pertencentes ao ST115, um isolado identificado com o ST2001 e um isolado atribuído ao ST69 com o complexo clonal ST69.

Tabela 31 Análise das sequências tipo dos 8 isolados do grupo filogenético D através de MLST

Isolado	Origem	*adk*	*fumC*	*gyrB*	*icd*	*mdh*	*purA*	*recA*	ST	Complexo Clonal
C1421	Raposa	20	45	41	43	5	32	2	**ST117**	
C1733	Javali	4	26	39	25	5	31	19	**ST115**	
C1737	Javali	4	26	39	25	5	31	19	**ST115**	
C1740	Javali	20	45	41	43	5	32	2	**ST117**	
C3065	Lobo Ibérico	21	35	27	6	5	5	4	**ST69**	ST69 cplx
C3068	Lobo Ibérico	200	3	17	6	45	5	191	**ST2001**	
C3080	Lince Ibérico	20	45	41	43	5	32	2	**ST117**	
C3085	Lince Ibérico	20	45	41	43	5	32	2	**ST117**	

4.4 Diversidade de Plasmídeos em Estirpes de *Escherichia coli* Produtoras de ESBL [quarta fase]

A quarta e última fase deste projecto pode ser ramificada em três sub-fases distintas, todas com o objectivo final de estudar a diversidade de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL.

A primeira sub-fase foi desenvolvida com o propósito de seleccionar as estirpes mais sensíveis à rifampicina para serem utilizadas como estirpes dadoras no processo de conjugação, e para tal foi realizada a medição da concentração mínima inibitória (CMI) dos 29 isolados previamente seleccionados. A segunda consistiu na experiência de conjugação bacteriana, através da qual foi possível ocorrer a transferência horizontal de genes de resistência entre as estirpes de *Escherichia coli* seleccionadas como dadoras e a estirpe receptora. A terceira e última de todo o estudo consistiu na caracterização fenotípica da resistência aos antibióticos das estirpes transconjugantes e no estudo dos grupos de incompatibilidade (Inc) dos plasmídeos dos isolados, tanto das estirpes dadoras como das estirpes transconjugantes.

O protocolo utilizado para a identificação dos plasmídeos através de "PCR-*based replicon typing*" (PBRT) permitiu de seguida realizar uma análise comparativa dos replicões presentes nas estirpes dadoras e nas estirpes transconjugantes. Esta análise comparativa foi também realizada relativamente aos fenótipos de resistência aos antibióticos, incluindo,

obviamente, os antibióticos beta-lactâmicos que caracterizam todas as estirpes de *Escherichia coli* seleccionadas para a realização deste estudo. Assim sendo, de seguida serão apresentados os resultados das três sub-fases da última fase do estudo.

4.4.1 Selecção de estirpes dadoras através da concentração mínima inibitória (CMI)

Para eleger as estirpes dadoras para o protocolo de conjugação foi realizado a medição da concentração mínima inibitória (CMI) à rifampicina dos 29 isolados previamente seleccionados. Todos os isolados foram testados em sete concentrações distintas de rifampicina (100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12µg/mL, 6µg/mL, 3µg/mL e 1,5µg/mL) (Tabela 32).

Tabela 32 Medição da CMI dos 29 isolados seleccionados na fase anterior

Grupo Filogenético D		**Grupo Filogenético B1**		**Grupo Filogenético A**	
Isolado	**CMI (µg/mL)**	**Isolado**	**CMI (µg/mL)**	**Isolado**	**CMI (µg/mL)**
C1421	25	C1417	12	C1422	25
C1733	6	C1419	25	C1732	12
C1737	12	C1420	25	C2515	12
C1740	12	C1425	25	C2517	25
C3065	25	C1735	12	C3064	12
C3068	25	C2509	25	C3066	12
C3080	6	C3061	12	C3072	25
C3085	6	C3067	12	C3077	25
		C3074	25	C5478	6
		C3079	25	C6831	25
		C3082	25		

Após o protocolo de CMI, dado que todas as estirpes apresentaram valores baixos, o que representa maior sensibilidade à rifampicina, todos eles foram seleccionados para funcionarem como estirpes dadoras para o protocolo de conjugação. Desta selecção de dadores, em 15 isolados foi identificada uma CMI de 25µg/mL (51.7%), em 10 foi observada uma CMI de 12µg/mL (34.5%) e em 4, uma CMI de 6µg/mL (13.8%) (Tabela 32). Entre estes 29 isolados com três CMIs distintas foram ainda detectadas 10 combinações distintas de genes produtores de resistência a antibióticos beta-lactâmicos ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{TEM\text{-}52}$,

$bla_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}a}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{TEM\text{-}1}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}a}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{TEM\text{-}52}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{SHV\text{-}12}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$) (Figura 20). Esta amostragem final de 29 estirpes dadoras é bastante representativa do grupo de isolados inicial, com os três grupos filogenéticos (A, B1 e D), com as nove espécies distintas de animal de origem (Lobo ibérico, Lince Ibérico, Javali, Dourada, Raposa, Veado, Coruja, Ave de Rapina, Ave dos Açores) e com as principais famílias de genes codificadores de β-lactamases (CTX-M, TEM e SHV), sendo portanto um bom ponto de partida para o protocolo de transferência de material genético através de conjugação.

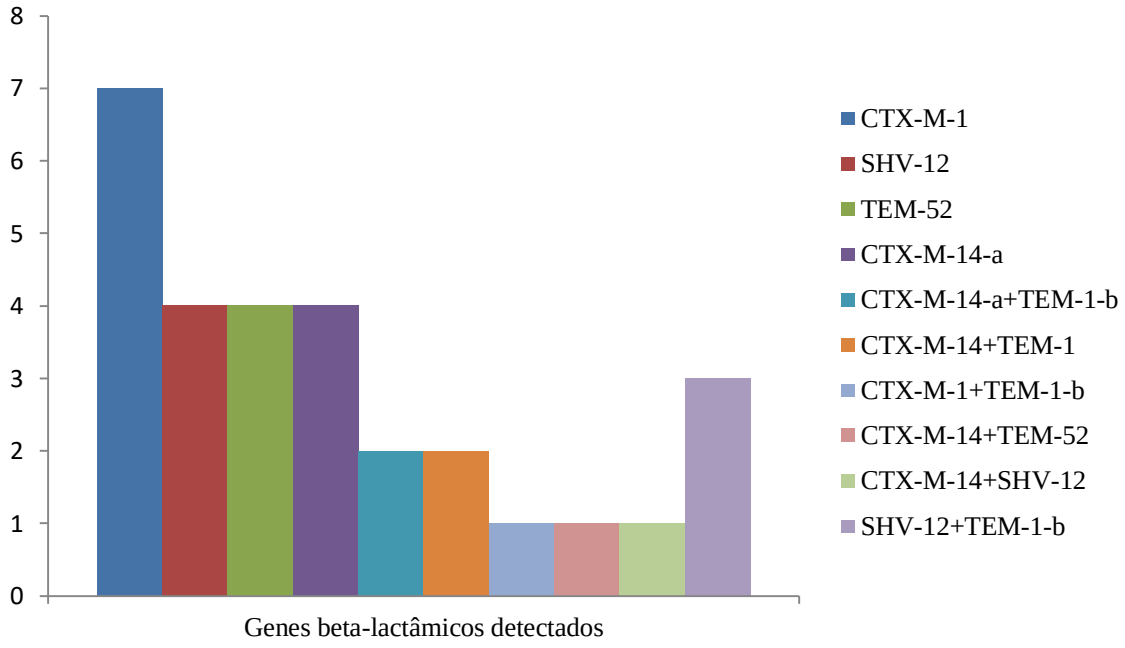


Figura 20 Número de isolados com distintas combinações de genes codificadores de β-lactamases entre os 29 isolados seleccionados para estirpes dadoras

4.4.2 Estirpes transconjugantes obtidas após o protocolo de conjugação

De forma a estudar a localização cromossómica ou plasmídica dos genes de resistência, procedeu-se à transferência horizontal de material genético entre bactérias através de conjugação e após a confirmação da transferência através de plasmídeos, foi aprofundado o estudo da sua diversidade.

As 29 estirpes dadoras foram colocadas, cada uma, em contacto com uma estirpe receptora de *Escherichia coli* (CSH26) com características bem definidas, como a resistência à rifampicina, a ausência de plasmídeos e a negatividade relativamente à lactose. Através deste contacto ocorreu a transferência de material genético de forma unidireccional, das estirpes dadoras para a estirpe receptora. Após este processo foi realizada a contagem dos transconjugantes (TC) em placas de agar MacConkey suplementadas com rifampicina e cefotaxima.

Assim sendo, após o processo de conjugação foram obtidas 21 estirpes transconjugantes (Tabela 33). Através de diferentes valores de contagem, foram identificadas a ausência ou presença de transconjugantes. Como é visível na Tabela 33, dos 29 isolados utilizados como estirpes dadoras, 21 (72.4%) conseguiram com sucesso formar estirpes transconjugantes, e assim os oito isolados marcados a vermelho (27.6%) foram retirados da selecção de isolados para a próxima etapa.

Tabela 33 Contagem das colónias transconjugantes em placas de agar MacConkey suplementadas com rifampicina e cefotaxima e número de identificação dos novos isolados transconjugantes

Grupo Filogenético D			**Grupo Filogenético B1**			**Grupo Filogenético A**		
Isolado Dador	**Contagem TC (Rif_{50}+CTX_5)**	**Estirpe TC**	**Isolado Dador**	**Contagem TC (Rif_{50}+CTX_5)**	**Estirpe TC**	**Isolado Dador**	**Contagem TC (Rif_{50}+CTX_5)**	**Estirpe TC**
C1421	0	--	C1417	≈300	C7460	C1422	0	--
C1733	≈672	C7455	C1419	≈1500	C7470	C1732	0	--
C1737	≈28	C7457	C1420	0	--	C2515	≥5000	C7473
C1740	≈282	C7458	C1425	≈2000	C7471	C2517	≥5000	C7474
C3065	≥5000	C7462	C1735	≥5000	C7456	C3064	≈300	C7461
C3068	≥5000	C7464	C2509	≥5000	C7472	C3066	≈1200	C7463
C3080	0	--	C3061	≈248	C7459	C3072	≥5000	C7475
C3085	≈30	C7467	C3067	0	--	C3077	≈29	C7465
			C3074	0	--	C5478	≈8	C7468
			C3079	≈1200	C7466	C6831	≥5000	C7469
			C3082	0	--			

As 21 estirpes transconjugantes criadas foram então seleccionadas e isoladas para uma posterior caracterização do seu fenótipo de resistência aos antibióticos e realização do estudo e análise dos plasmídeos, tanto dos transconjugantes como das estirpes dadoras.

4.4.3 Caracterização fenotípica e plasmídica das estirpes transconjugantes obtidas

Concluído este estudo, a análise da diversidade plasmídica foi realizada a 21 estirpes dadoras e a 21 estirpes transconjugantes. Nesta selecção de isolados estão presentes as nove espécies de animais selvagens com que o estudo foi iniciado (número de isolados): lobo ibérico (6), javali (4), lince Ibérico (3), dourada (3), raposa (1), veado (1), coruja (1), ave de rapina (1), ave do arquipélago dos Açores (1) (Figura 21), divididas por três grupos filogenéticos (A, B1 e D) e com sete combinações diferentes de genes codificadores de beta-lactamases ($bla_{CTX\text{-}M\text{-}1}$, $bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{TEM\text{-}52}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}a}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14\text{-}a}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$, $bla_{CTX\text{-}M\text{-}14}$+$bla_{SHV\text{-}12}$, $bla_{SHV\text{-}12}$+$bla_{TEM\text{-}1\text{-}b}$) (Tabela 34).

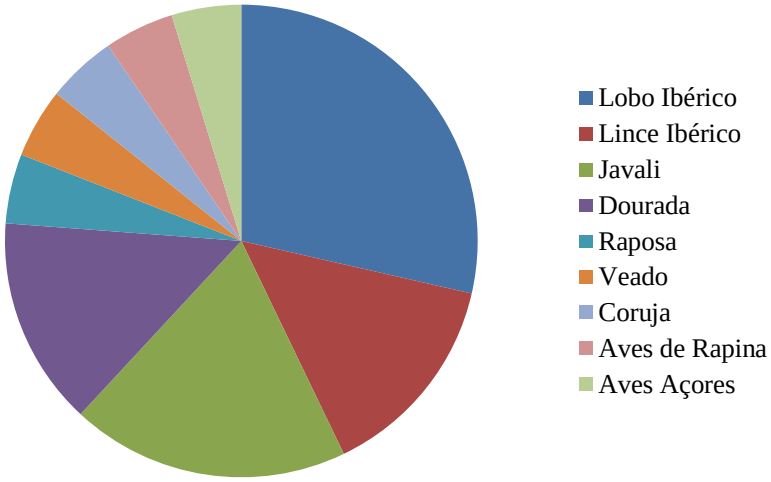


Figura 21 Divisão dos 21 isolados finais por animal de origem

Relativamente à análise dos perfis plasmídicos dos dadores, foi observada uma vasta combinação de replicões. Num total de 20 combinações distintas identificadas, os replicões mais observados nas estirpes dadoras foram: IncK em 17 isolados, IncI1 em 14 isolados e IncFIB em 12 isolados (Tabela 34 e Figura 22). No caso das estirpes dadoras, os perfis fenotípicos de resistência já tinham sido previamente registados.

Em relação aos transconjugantes obtidos, o fenótipo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos foi observado em todas as estirpes (100%). Relativamente aos fenótipos de resistência a outros antibióticos, nas 21 estirpes transconjugantes obtidas, foram observados cinco fenótipos distintos de resistência (Tabela 34).

Tabela 34 Comparação das estirpes de *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases utilizadas como dadoras e as estirpes transconjugantes (TC) (a vermelho) obtidos através de conjugação

Estirpe Dadora	Origem	Grupo Filogenético	Genes β-lactamases	Estirpes Transconjugantes (TC)	Fenótipo de resistência a não beta-lactâmicos[a] Dadores	Fenótipo de resistência a não beta-lactâmicos[a] TC	Plasmídeos Dadores	Plasmídeos TC
C1733	Javali	D	CTX-M-1	**C7455**	ST; SXT	**SXT**	I1, FIB, T, FrepB, B/O	**I1, T, B/O**
C1735	Javali	B1	CTX-M-1	**C7456**	SXT	**SXT**	I1, FIB, FrepB, K	**I1**
C1737	Javali	D	CTX-M-1	**C7457**	NA; SXT	**SXT**	I1, FIB, T, FrepB, K, B/O	**I1, T, B/O**
C1740	Javali	D	CTX-M-1	**C7458**	NA; TE; SXT; CI	**SXT**	I1, FIB, P, FrepB, K, B/O	**I1, P, B/O**
C3061	Lobo Ibérico	B1	CTX-M-1	**C7459**	NA; TE	**TE**	I1, FIB, K	**I1, FIB**
C1417	Veado	B1	TEM-52	**C7460**	Susceptível	**Susceptível**	FIB, K	--
C3064	Lobo Ibérico	A	CTX-M-1	**C7461**	Susceptível	**Susceptível**	N, K	--
C3065	Lobo Ibérico	D	CTX-M-1	**C7462**	TE; ST; SXT; CHL; GE; TB	**CHL^{I}**	N, FIA, FIB, P, FrepB	**N, P**
C3066	Lobo Ibérico	A	CTX-M-14-a	**C7463**	TE	**Susceptível**	W, K, B/O	**W, B/O**
C3068	Lobo Ibérico	D	CTX-M-14-a y TEM-1-b	**C7464**	NA; TE; ST; SXT	**Susceptível**	I1, P, T	**I1, P, T**
C3077	Lince Ibérico	A	CTX-M-14-a	**C7465**	TE; ST	**Susceptível**	I1, FIB, K, B/O	**B/O**
C3079	Lince Ibérico	B1	CTX-M-14-a	**C7466**	NA; TE; ST; CI	**Susceptível**	FIB, Y, FrepB, K, B/O	**B/O**
C3085	Lince Ibérico	D	SHV-12	**C7467**	NA; ST; SXT	**ST**	I1, FIB, FrepB	**I1**
C5478	Raposa Ver.	A	SHV-12 + TEM-1-b	**C7468**	NA; TE; ST; SXT; CI; CHL	**ST^{I}; CHL**	I1, FIB, FrepB, K	**I1**
C6831	Ave Açores	A	CTX-M-14 + SHV-12	**C7469**	TE	**Susceptível**	I1, X, P, K	**I1**
C1419	Coruja	B1	TEM-52	**C7470**	Susceptível	**Susceptível**	K	--
C1425	Ave Rapina	B1	SHV-12	**C7471**	NA; TE; ST; SXT; GE; TB	**CHL^{I}**	N, FrepB, K	--
C2509	Dourada	B1	TEM-52	**C7472**	TE; ST; SXT; CHL	**Susceptível**	I1, FIC, K	**I1, FIC**
C2515	Dourada	A	SHV-12	**C7473**	ST; SXT; CHL	**ST^{I}; CHL**	I1, FrepB, K	**I1**
C2517	Dourada	A	TEM-52	**C7474**	Susceptível	**Susceptível**	I1, K	**I1**
C3072	Lobo Ibérico	A	SHV-12	**C7475**	NA; TE; ST; CHL	**ST; CHL**	I1, FIB, T, K	**I1, T**

[a] NA, ácido nalidíxico; TE, tetraciclina; ST, estreptomicina; SXT, sulfametoxazol/ trimetoprim; GE, gentamicina; CI, ciprofloxacina; TB, tobramicina; CHL, cloranfenicol

Assim sendo, é possível fazer uma análise comparativa aos fenótipos de resistência das estirpes dadoras e das estirpes transconjugantes. Foram detectados cinco fenótipos de resistência a antibióticos não beta-lactâmicos nas estirpes de *Escherichia coli* transconjugantes. Das 21 estirpes obtidas, quatro revelaram resistência ao sulfametoxazol/ trimetoprim (SXT), três demonstraram possuir resistência à estreptomicina e ao cloranfenicol (ST+CHL), duas exibiram resistência apenas ao cloranfenicol (CHL), uma estirpe revelou resistência apenas á estreptomicina (ST) e outra à tetraciclina (TE) (Tabela 34). Resumindo, num total de 21 transconjugantes obtidos, 11 adquiriram resistência a pelo menos um antibiótico (52.4%), enquanto 10 demonstraram ser sensíveis a todos os antibióticos (47.6%).

No que diz respeito à análise plasmídica do transconjugantes, foram observadas 10 combinações distintas de replicões, entre elas, os replicões mais vezes identificados foram: IncI1 em 13 estirpes transconjugantes, IncB/O em 6 estirpes e IncT em 4 estirpes (Tabela 34 e Figura 22). Esta análise demonstra um nível elevado de transferência do replicão IncI1 entre as estirpes dadoras e as transconjugantes, em 61.9% dos processos de conjugação, mostrando que este replicão pode estar altamente associado a estirpes de *Escherichia coli*.

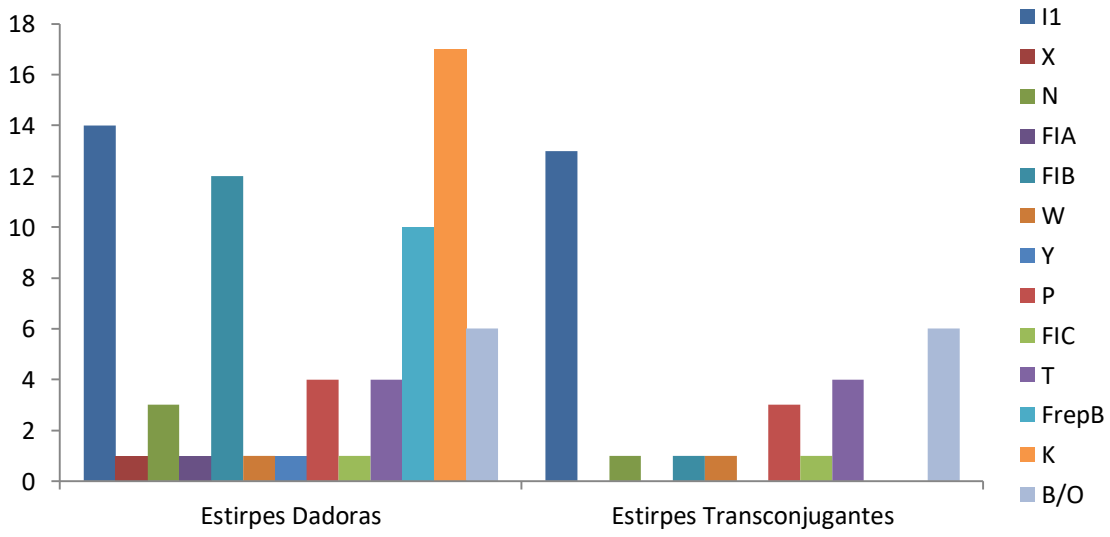


Figura 22 Comparação dos plasmídeos nas estirpes dadoras e transconjugantes

Os resultados desta experiência permitiram uma análise mais profunda das estirpes transconjugantes, que sugere a existência de algumas ligações interessantes entre o tipo de beta-lactamase das estirpes dadoras e o fenótipo de resistência das estirpes transconjugantes. Esta análise é debatida no capítulo seguinte.

Discussão

“I would rather have questions that can’t be answered than answers wich can’t be questioned.”

- Richard Feynman -

Capítulo 5 - Discussão

O desenvolvimento e detecção de bactérias resistentes aos antibióticos em ecossistemas supostamente livres de pressões selectivas e de contaminação humana, tem sido alvo de numerosos estudos, especialmente em animais selvagens que se enquadram no perfil ambiental previamente definido (Costa *et al.* 2008; Goncalves *et al.* 2012b; Poeta *et al.* 2009; Radhouani *et al.* 2013a; Silva *et al.* 2011). A crescente proximidade dos animais selvagens relativamente aos ecossistemas humanos, em busca de alimento ou devido à invasão dos seus *habitats*, são possíveis explicações para a contaminação com bactérias multirresistentes a agentes microbianos.

A utilização disseminada e exacerbada de agentes antimicrobianos, tanto em medicina humana como veterinária; o contacto directo entre o homem e algumas espécies animais; o uso de antibióticos como promotores de crescimento (até 2006) e profilaxia em explorações animais; e o contacto com recursos naturais (solo, água, vegetais) contaminados com matérias orgânicas resistentes aos antibióticos (excrementos, estrumes, alimentos de origem animal), constituem elementos importantes do perigoso e actual problema de saúde pública que é a disseminação de bactérias multirresistentes (Bronzwaer *et al.* 2002; Goossens 2009; McEwen e Fedorka-Cray 2002).

Relativamente aos animais selvagens, a existência de *Escherichia coli* na microflora bacteriana intestinal, associada à capacidade natural das bactérias de adquirirem, transferirem e acumularem genes de resistência, torna esta espécie de microorganismo um excelente "indicador" da propagação da resistência e define os animais selvagens como reservatórios de genes de resistência, desempenhando um papel fulcral na propagação dos mesmos (Carroll *et al.* 2015; Costa *et al.* 2008; Marinho *et al.* 2014). A existência de diversos estudos nesta área é extremamente importante, de forma a monitorizar a dispersão das resistências aos antibióticos em termos territoriais e relativamente à origem animal. Estes estudos tornam-se mais relevantes em espécies que interferem directamente na nossa cadeia alimentar, como é o caso da dourada (*Sparus aurata*) e do javali (*Sus scrofa scrofa* L.), ou mesmo em espécies em vias de extinção, como o lobo Ibérico (*Cani lupus signatus*) e o lince Ibérico (*Lynx pardinus*) (Goncalves *et al.* 2012a; Goncalves *et al.* 2012b; Poeta *et al.* 2009; Sousa *et al.* 2011).

Sendo um dos problemas de sáude pública mais importantes do século, que afecta também o ser humano, exige uma abordagem multidisciplinar, com um enfoque muito particular na investigação, mas também com campanhas de sensibilização e acesso a formação e informação pelos profissionais da área, de forma a reduzir o uso excessivo de antibióticos e as mortes associadas.

A realização deste estudo permitiu caracterizar fenotípica e genotipicamente a resistência a diversos antibióticos, habitualmente utilizados em clínica, em isolados de *Escherichia coli*, obtidos de amostras fecais de diversas origens e de várias espécies de animais selvagens: lobo Ibérico (*Canis lupus signatus*), dourada (*Sparus aurata*), lince Ibérico (*Lynx pardinus*), javali (*Sus scrofa scrofa* L.), raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), aves selvagens do arquipélago dos Açores (*Sylvia atricapilla*), raposa, aves de rapina, veado e coruja (Costa *et al.* 2006; Goncalves *et al.* 2012a; Goncalves *et al.* 2012b; Poeta *et al.* 2009; Radhouani *et al.* 2013a; Silva *et al.* 2011; Sousa *et al.* 2011).

Durante o estudo foi dado especial ênfase à relação clonal entre as estirpes de *E. coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro e foi feito um enfoque especial na análise da diversidade plasmídica, pois a capacidade única das bactérias de partilharem elementos extra-cromossómicos, que codificam genes de resistência, como plasmídeos, é um dos principais factores de disseminação destes genes.

Assim sendo, nos parágrafos e secções subsequentes serão debatidos, analisados e discutidos os resultados obtidos após a realização deste estudo sobre a diversidade plasmídica em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro.

Na primeira fase deste estudo foi feita a selecção dos isolados a utilizar, a verificação do seu perfil fenotípico relativamente à susceptibilidade aos antibióticos e a caracterização dos grupos filogenéticos. Todas os isolados seleccionadas foram previamente alvo de outros estudos por parte do grupo de investigação, todos eles focados em estirpes de *Escherichia coli* isoladas de amostras fecais provenientes de animais selvagens.

Os 53 isolados analisadas inicialmente foram divididas por sete estudos distintos e nove espécies animais diferentes, todas elas com origem Ibérica, em Portugal ou Espanha (Costa *et al.* 2006; Goncalves *et al.* 2012a; Goncalves *et al.* 2012b; Poeta *et al.* 2009; Radhouani *et al.* 2013a; Silva *et al.* 2011; Sousa *et al.* 2011). Assim sendo, inicialmente, foram selecionados: uma coruja (1,9%), dois veados (3,8%), duas aves selvagens do

arquipélago dos Açores (3,8%), três raposas das quais duas eram raposas vermelhas (5,7%), quatro aves de rapina (7,5%), oito javalis (15,1%), nove linces Ibéricos (16.9%), 10 douradas (18,9%), e 14 lobos Ibéricos (26,4%). O conjunto de isolados seleccionados é bastante interessante, completo e representativo, pois possui animais de várias espécies, de vários *habitats* naturais distintos, com diferentes regimes alimentares e de diferentes regiões da Península Ibérica, algumas espécies de animais em vias de extinção e algumas espécies de animais directamente conectadas com o ser humano através da cadeia alimentar.

Tendo em conta os *habitats* naturais, a população em estudo contém animais provenientes do meio aquático, como as douradas (18,9%), animais provenientes do meio terrestre, como veados, raposas, javalis, linces e lobos Ibéricos (67,9%), e animais com maior mobilidade que têm acesso ao meio aéreo, como as corujas, aves selvagens dos Açores e as aves de rapina (13,2%). Quanto ao regime alimentar, a selecção de isolados possui: animais carnívoros, como as raposas, as aves de rapina, as douradas, as corujas e os linces e lobos Ibéricos (77,3%); animais herbívoros, como os veados (3,8%); e animais omnívoros, como os javalis e as aves selvagens dos Açores (18,9%). Relativamente à origem das estirpes de *Escherichia coli* obtidas, a maioria (83,1%) das amostras foi obtida em território nacional, em parques e reservas naturais, ou em *habitats* naturais das espécies animais. Apenas as amostras provenientes de lince Ibérico (16,9%) foram obtidas em Espanha.

Esta análise da origem dos isolados e do seu método de colheita é extremamente importante e relevante, de forma a formular e teorizar possíveis rotas de colonização dos animais com estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro. Relativamente ao lobo Ibérico, a aquisição de bactérias produtoras de ESBL pode ser explicada pelo comportamento deste animal como predador, o facto de se deslocar largas distâncias em busca de alimento, expondo o organismo a amostras fecais de outros animais ou mesmo humanos, e o facto de consumir presas previamente infectadas com estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL, como javalis selvagens (Goncalves *et al.* 2012b; Poeta *et al.* 2009). A proximidade desta espécie com o Homem, através da organização de conservação do lobo Ibérico e o facto de utilizarem antibióticos durante alguns processos de monitorização (anestesia, rastreamento), podem igualmente ser acções produtoras de pressões selectivas (Goncalves *et al.* 2012b). Uma teoria semelhante é aplicável aos isolados de lince Ibérico que, tal como o lobo Ibérico, é uma espécie em vias de extinção, que deve estar em constante vigília e monitorização (Goncalves *et al.* 2012a). No que diz respeito aos isolados de dourada,

a colonização e disseminação de *E. coli* produtoras de ESBL nesta espécie pode ser explicada pela exposição a amostras fecais de outras espécies ou até mesmo do Homem, através do meio aquático em que habitam (Sousa *et al.* 2011). Outro estudo com observação de isolados de dourada na Tunísia, apoia também esta explicação e sugere que as descargas de poluentes industriais directamente no mar tem também um papel fundamental (Zouiten *et al.* 2017). A contaminação desta espécie com bactérias multirresistentes é particularmente preocupante, pois é considerada uma das espécies marinhas mais consumidas na dieta mediterrânica (Scarano *et al.* 2014).

Similarmente ao que se observou no lobo Ibérico, o facto das raposas se apresentarem no topo da cadeia alimentar, caçando e consumindo animais já contaminados como coelhos selvagens e aves, é uma explicação plausível para a acumulação de bactérias produtoras de ESBL nesta espécie animal (Radhouani *et al.* 2013a). Um estudo realizado no Reino Unido apoia a teoria previamente exposta e acrescenta ainda a possibilidade da contaminação ocorrer através de pequenos roedores que têm contacto tanto com as raposas como com conjuntos de suínos em locais de produção industrial, onde os antibióticos são utilizados frequentemente (Carson *et al.* 2012).

Relativamente ao javali, o seu regime alimentar e a capacidade de viajar largas distâncias em busca de alimento, a proximidade de territórios do ser humano e de outras espécies animais e a possibilidade de se alimentar ocasionalmente de restos alimentares do Homem, são todas rotas prováveis de contaminação desta espécie com *E. coli* produtora de ESBL (Poeta *et al.* 2009). Tal como a dourada, o javali é um animal selvagem que é caçado e é frequentemente consumido pelo ser humano, tornando a detecção de bactérias multirresistentes, nesta espécie, algo ainda mais preocupante (Poeta *et al.* 2009; Sasaki *et al.* 2013).

A grande mobilidade das aves facilita bastante a troca e aquisição de bactérias multirresistentes, como é o caso das aves selvagens dos Açores. Esta espécie é frequentemente avistada em quintas e zonas urbanas. Esta proximidade ao ser humano, através destas áreas e a popularidade turística dos Açores para a realização de actividades ao ar livre, são prováveis rotas de disseminação de bactérias produtoras de ESBL. A interacção com outras aves migratórias da América do Norte e da Europa, são também rotas de contaminação e disseminação possíveis (Silva *et al.* 2011). Por fim, muitos dos isolados analisados neste estudo foram colhidas em Parques e Reservas Naturais, como isolados de

aves de rapina, veados e coruja. A proximidade do Homem destas áreas através de actividades ao ar livre como observação de pássaros ou caminhadas, pode ser uma explicação para a aquisição de *E. coli* produtora de ESBL (Costa *et al.* 2006).

Todas estas rotas de aquisição e disseminação são apenas sugestões mas revelam que os animais selvagens são reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos e que o Homem tem um papel crucial na disseminação e contaminação dos diferentes ecossistemas.

Na primeira fase do estudo foi também analisado o fenótipo de susceptibilidade aos antibióticos dos 53 isolados seleccionados. Assim sendo, uma análise detalhada dos fenótipos de resistência em cada espécie é necessária e importante. Todos os isolados seleccionados foram testadas para 16 antibióticos distintos, mas só foram observadas resistências a oito antimicrobianos: ácido nalidíxico, tetraciclina, estreptomicina, sufametoxazol/trimetoprim, gentamicina, ciprofloxacina, tobramicina e cloranfenicol. Dos 53 isolados seleccionados, seis (11,3%) demonstraram ser susceptíveis a todos os antibióticos em estudo, e sete isolados (13,2) demonstraram ser resistentes ao máximo de seis antibióticos em simultâneo, curiosamente quatro deles com o mesmo perfil fenotípico de resistência (um lobo Ibérico, um lince Ibérico e duas raposas), sendo resistentes à estreptomicina, ao sulfametoxazol/trimetoprim, à tetraciclina, ao ácido nalidíxico, à ciprofloxacina e ao cloranfenicol. O antibiótico mais frequente nos fenótipos de resistência foi a tetraciclina, aparecendo no fenótipo de 38 isolados (71,7%), algo também observado noutros estudos realizados com animais selvagens (Alonso *et al.* 2016a; Carroll *et al.* 2015). Contrariamente, a resistência menos comum foi à tobramicina, aparecendo apenas no fenótipo de dois isolados (3,8%), um isolado de ave de rapina e um de lobo Ibérico, algo também observado em estudos prévios (Costa *et al.* 2008; Radhouani *et al.* 2009).

Numa análise mais detalhada de cada espécie animal em estudo, é possível observar alguns padrões de resistência. Relativamente aos isolados obtidos de lobo Ibérico, a resistência mais comummente observada foi à tetraciclina, em 12 isolados (85,7%), dos quais três apenas apresentaram resistência a esse antibiótico. Dois isolados (14,3%) mostraram ser susceptíveis a todos os antibióticos testados e igualmente dois isolados (14,3%) mostraram ser resistentes ao máximo de seis antibióticos em simultâneo. Esta análise é apoiada por todos os estudos realizados sobre o lobo Ibérico por Gonçalves e colaboradores (Goncalves *et al.* 2013; Goncalves *et al.* 2012b). No caso dos isolados obtidos a partir de amostras fecais de lince Ibérico, a totalidade das estirpes (100%) mostrou ser resistente à estreptomicina, em sete

casos (77,8%), associada com a tetraciclina. Apenas um isolado (11,1%) demonstrou ser resistente ao máximo de seis antibióticos em simultâneo. Estes resultados são apoiados pelos estudos prévios sobre o lince ibérico e é interessante observar também similitudes entre o fenótipo de resistência desta espécie e da sua principal presa, o coelho selvagem (Goncalves *et al.* 2010; Sousa *et al.* 2014). Em relação aos isolados obtidos de douradas, a resistência mais comum foi observada em oito isolados (80%) e foi relativa ao cloranfenicol. Dois isolados (20%) não apresentaram resistência a qualquer antibiótico, sendo portanto susceptíveis. É importante também mencionar um padrão de resistência igual em seis isolados (60%), com um fenótipo composto por sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina, estreptomicina e cloranfenicol. Esta análise é suportada e observada também noutras espécies marinhas como o salmão e o golfinho (Cantas *et al.* 2011; Stewart *et al.* 2014). No que diz respeito às raposas, em ambas os isolados de raposas vermelhas foi observado o mesmo perfil fenotípico de resistência. Os dois isolados demonstraram ser resistentes a seis antibióticos: estreptomicina, tetraciclina, sulfametoxazole/trimetorpim, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e cloranfenicol. Este perfil é em parte concordante com outros estudos do mesmo autor, que apresentam a estreptomicina e a tetraciclina como as resistências mais comuns nesta espécie animal (Radhouani *et al.* 2013b). Todos os isolados de *E. coli* de javali selvagem (100%) demonstraram ser resistentes ao sulfametoxazole/trimetoprim, inclusivamente dois (25%) possuem um fenótipo de resistência constituído apenas por esse antibiótico. Resultados semelhantes foram observados nos isolados de lobo Ibérico, colhidos igualmente no norte de Portugal, curiosamente, predadores do javali selvagem (Goncalves *et al.* 2013). As aves selvagens do arquipélago dos Açores, apresentaram ambas o mesmo fenótipo de resistência a apenas um antibiótico, a tetraciclina. Apesar da sua origem bastante longínqua relativamente aos restantes isolados, este fenótipo único só foi observado em mais uma espécie deste estudo, o lobo Ibérico. Por fim, em relação à análise do fenótipo de resistência das várias estirpes de *E. coli* isoladas a partir de vários animais selvagens, foram observadas resistências a dois antibióticos mais comuns, foram eles a tetraciclina e o ácido nalidíxico (Costa *et al.* 2006). Estes fenótipos de resistência assemelham-se aos observados nos isolados de de javali selvagem, possivelmente devido ao do local de colheita (Poeta *et al.* 2009). Nesta selecção variada de animais foi ainda possível observar duas estirpes (uma de veado e outra de coruja) susceptíveis a todos os antibióticos testados.

Através dos resultados compilados na primeira fase é também possível fazer uma análise das β-lactamases detectadas, visto que todas as estirpes de *Escherichia coli* estudadas são produtoras destas enzimas. Realizando uma análise superficial, foram observadas as três principais famílias de β-lactamases, CTX-M, TEM e SHV, por vezes combinadas entre si na mesma estirpe. Assim sendo, relativamente à família CTX-M, foram detectadas 30 estirpes (56,6%) produtoras desta β-lactamase, subdivididas pelas 12 estirpes (22,6) produtoras de CTX-M-1 e 18 isolados (34%) produtores de CTX-M-14. Em relação às estirpes produtoras de β-lactamases da família TEM, foram observadas 24 isolados (45,3%) deste tipo, subdivididos por 15 estirpes (28,3%) produtoras de β-lactamases do tipo TEM-1 e 9 isolados (17%) produtores de TEM-52. As β-lactamases do tipo SHV-12 foram produzidas por 17 isolados (32,1%). Resumindo, o tipo de β-lactamase mais comum na selecção de isolados realizada foi o CTX-M-14, enquanto a β-lactamase menos observada foi do tipo TEM-52.

Nas décadas de 1980 e 1990, os tipos de β-lactamase mais comuns eram TEM e a SHV, contudo, após uma primeira aparição em 1989 na Alemanha em ambiente clínico, as estirpes do tipo CTX-M cresceram exponencialmente desde o ano de 2000, o que explica o elevado número de isolados do tipo CTX-M neste estudo (Hasan *et al.* 2016; Livermore *et al.* 2007; Pitout 2010). Inicialmente as β-lactamases do tipo TEM e SHV estavam mais presentes em estirpes de *Klebsiella* spp. e raramente em estirpes de *Escherichia coli* (Livermore 2012). Porém, hoje em dia, estas três grandes famílias de β-lactamases estão presentes em diferentes estirpes bacterianas e em diferentes ambientes, muito devido à sua transferência entre bactérias através de plasmídeos (Livermore *et al.* 2007).

Numa análise ligeiramente mais aprofundada, é possível associar o tipo de β-lactamase produzida à espécie animal da qual foi feita a colheita do isolado. Desta forma, a enzima CTX-M-1 foi principalmente encontrada nas estirpes isoladas de amostras de javali selvagem (100%) e em estirpes de lobo Ibérico (28,6%), o que pode ser explicado pela relação presa-predador que existe entre estes dois animais e também pelo semelhante local de colheita das amostras (Goncalves *et al.* 2013). A β-lactamase CTX-M-14 foi frequentemente observada em isolados de lobo Ibérico (42,9%), de lince Ibérico (66,7%), em isolados de aves selvagens dos Açores, mas associada à enzima SHV-12 (100%) e em isolados de aves de rapina (75%). Relativamente à família TEM, a β-lactamase TEM-1 foi observada em todas as raposas (100%), enquanto todas os isolados de veado (100%) e de coruja (100%) mostraram ser produtores da enzima TEM-52, bem como quatro isolados de dourada (40%). Por fim, a β-

lactamase SHV-12 produzida por seis isolados de dourada (60%) e foi também observada nos isolados de raposa vermelha (100%). Sendo toda a selecção de isolados proveniente de animais selvagens, que muitas vezes estão interligados através de relações tróficas, e sendo os genes β-lactamâmicos de origem plasmídica, é compreensível a partilha e transferência das mesmas famílias de β-lactamases (Paterson e Bonomo 2005).

Com o objectivo de estreitar o número de isolados em estudo, mantendo uma selecção de isolados diversificada e representativa da selecção inicial, na segunda fase do estudo foi realizada uma electroforese em campo pulsado (PFGE) de forma a detectar possíveis padrões de semelhança nos diversos clones. Esta técnica de tipagem molecular, apesar de não ser perfeita, proporciona níveis elevados de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (Ribot *et al.* 2006).

Após a realização da PFGE e da observação dos géis obtidos, foi possível definir e marcar alguns isolados como epidemiologicamente relacionados. Esta classificação dos padrões de PFGE como indistinguíveis permitiu reduzir o número de isolados em estudo para 44, ou seja, permitiu reduzir em 17%. A análise dos padrões consoante o número de bandas, criado por Fred Tenover, apesar de ser eficaz, não é 100% sensível e específico, pois está dependente do erro humano e, como o próprio refere, o método deve ser realizado em pequenos conjuntos de amostras com 30 ou menos isolados (Tenover *et al.* 1995).

Numa análise mais aprofundada dos nove isolados retirados do estudo, é de realçar que a comparação dos padrões de PFGE só foi realizada entre 18 isolados de cada vez, ou seja, a comparação apenas foi realizada entre isolados colocados no mesmo gel de electroforese. Desta forma, dos 9 isolados retirados do estudo, cinco pertenciam a isolados de dourada (55,6%), uma pertencia a isolados de lobo Ibérico (11,1%), uma de lince Ibérico (11,1%), uma de raposa vermelha (11,1%) e uma de ave selvagem do arquipélago dos Açores (11,1%). Assim, a selecção de douradas, que era a segunda maior com 10 isolados, logo a seguir à de lobo Ibérico, sofreu uma redução substancial de 50%, o que significa que existiam vários clones da mesma estirpe bacteriana na selecção feita de isolados obtidos de amostras de dourada.

No seguimento desta análise, também os isolados de raposa vermelha e aves selvagens dos Açores, sofreram uma redução de 50% visto que inicialmente existiam dois isolados de cada espécie, que pelo que foi possível observar possuíam o mesmo clone bacteriano de

Escherichia coli. A observação de padrões semelhantes e o estudo da relação clonal das bactérias através de PFGE, apoiam a provável transferência de bactérias e genes de resistência a antibióticos entre os animais (Saenz *et al.* 2004). Assim, através da análise da relação clonal entre os isolados e do dendrograma realizado é possível concluir que existe uma elevada diversidade clonal entre os isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL.

A terceira fase consistiu em definir critérios bem específicos para reduzir o volume de isolados em estudo, de forma a facilitar a seguinte fase, a de conjugação. Como mencionado previamente, na secção de resultados, foram definidos três critérios de análise: os padrões de restrição obtidos através de electroforese de campos pulsados; a origem dos isolados; e o tipo de β-lactamase de espectro largo produzido. A definição destes parâmetros permitiu desta forma reduzir o número de isolados em estudo de 44 para 29, sendo portanto eliminados do restante estudo 15 isolados (28,3% do total de amostras obtido na fase anterior), dos quais cinco obtidos a partir de amostras de lobo Ibérico (33,3%), três isolados de lince ibérico (20%), três isolados de javali selvagem (20%), dois isolados de dourada (13,3%), um isolado de amostras de veado (6,7%) e um de ave de rapina (6,7%). Em termos de espécie, esta redução do número de isolados, nada afectou a representatividade de cada espécie, pelo contrário, veio equilibrar o número de isolados de cada espécie, pois a espécie que sofreu uma maior diminuição foi o lobo Ibérico, que inicialmente era a espécie mais representada, com 14 isolados. Relativamente aos tipos de β-lactamase produzidos pelos isolados eliminados, foram observados sete genótipos distintos (número de isolados): $bla_{\text{CTX-M-14}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$ (4), $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (3), $bla_{\text{SHV-12}}$ (3), $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (2), $bla_{\text{TEM-52}}$ (1), $bla_{\text{CTX-M-1}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$ (1) e $bla_{\text{SHV-12}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$ (1). É de realçar que todas estas combinações diferentes de genes que produzem resistência aos antibióticos beta-lactâmicos foram também mantidas e observadas nos 29 isolados que continuaram no estudo.

Consequentemente, é possível realizar uma análise mais detalhada dos 29 isolados seleccionados para dar continuação ao estudo. Nesta porção de isolados, foram observadas todas as nove espécies que iniciaram o estudo: oito isolados (27,6%) obtidos de lobo Ibérico, cinco isolados (17,2%) de lince Ibérico, também cinco isolados (17,2%) de javali selvagem, três isolados (10,3%) obtidos de amostras de dourada, três isolados (10,3%) de aves de rapina, dois isolados (6,9%) de raposa, dos quais um obtido de raposa vermelha, e apenas uma unidade obtida de veado (3,5%), um isolado (3,5%) de coruja e um isolado (3,5%) a representar as aves selvagens do arquipélago dos Açores. Estes dados revelam uma selecção

mais equilibrada relativamente ao número de isolados por espécie, como é possível comparar com a análise realizada da primeira fase, mas igualmente representativa, com todas as nove espécies iniciais. Em relação aos genótipos de produção de β-lactamases, tal como na selecção inicial, foram observados nos 29 isolados eleitos os mesmos nove conjuntos de genes produtores de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Assim sendo, foram observadas as seguintes nove combinações (número de isolados): $bla_{\text{CTX-M-1}}$ (7), $bla_{\text{CTX-M-14}}$ (4), $bla_{\text{SHV-12}}$ (4), $bla_{\text{TEM-52}}$ (4), $bla_{\text{CTX-M-14}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$ (4), $bla_{\text{SHV-12}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$ (3), $bla_{\text{CTX-M-1}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$ (1), $bla_{\text{CTX-M-14}}$+$bla_{\text{SHV-12}}$ (1), $bla_{\text{CTX-M-14}}$+$bla_{\text{TEM-52}}$ (1). Tal como previamente observado, nesta secção de análise e discussão, a β-lactamase mais comum foi do tipo CTX-M, tanto CTX-M-1 e CTX-M-14, algo que tem vindo a ser observado em ambiente clínico e na natureza (Livermore *et al.* 2007; Pitout 2010).

Outra forma de analisar, avaliar e diferenciar os isolados seleccionados foi através da determinação do grupo filogenético. A análise do grupo filogenético dos 29 isolados seleccionados na terceira fase, permitiu dividi-los entre três dos quatro grupos filogenéticos principais, A, B1 e D (Clermont *et al.* 2000). Os isolados mais virulentos, que geralmente provocam infecções extraintestinais são associados ao grupo B2 e também ao grupo filogenético D, pelo contrário, as estirpes comensais, menos virulentas, são associadas aos grupos filogenéticos A e B1. Consequentemente, nos 29 isolados seleccionados na terceira fase (e nos 53 isolados iniciais), foram observados três grupos filogenéticos distintos: 8 isolados (27,6%) foram associados ao grupo filogenético D, 11 isolados (37,9%) ao grupo B1 e 10 isolados (34,5%) associados ao grupo A, não existindo nenhum isolado de *Escherichia coli* associado com o grupo filogenético B2. Este rácio, que evidencia uma percentagem muito maior de estirpes comensais associadas aos grupos filogenéticos B1 e A, pode ser explicado pela origem fecal das amostras (Pinto *et al.* 2010). O facto de serem isolados obtidos de animais selvagens, com contacto muito reduzido ou inexistente com antibióticos e ambientes clínicos, pode explicar esta predominância das estirpes comensais do grupo B1 e A. Estudos prévios dos grupos filogenéticos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL relatam algo semelhante a este estudo, a ausência de isolados associados ao grupo B2, e sugerem a existência de uma compensação entre a resistência e a virulência (Canton e Coque 2006).

Por fim, na terceira fase do estudo foi realizada uma tipificação das sequências *multilocus* dos isolados associados ao grupo filogenético D. A potencial patogenicidade e os

fenótipos virulentos geralmente associados às estirpes atribuídas a este grupo levou à necessidade de realizar uma caracterização mais pormenorizada destes isolados de *Escherichia coli* (Wirth *et al.* 2006). Como referido previamente na secção de resultados, os oito isolados de *E. coli* produtores de ESBL, foram designados a quatro STs distintos: a quatro isolados (50%) foi atribuído o ST117, dois isolados (25%) foram identificados com o ST115, um isolado (12,5%) identificado com o ST2001 e um isolado (12,5%) foi atribuído ao ST69 com o complexo clonal ST69. Numa análise mais detalhada, relativamente ao ST117, no caso deste estudo foi observado em associação com três espécies distintas, raposa (um isolado), javali selvagem (um isolado) e lince Ibérico (dois isolados); com diferentes tipos de gene produtores de β-lactamases ($bla_{\text{CTX-M-14}}$+$bla_{\text{TEM-1}}$; $bla_{\text{CTX-M-1}}$; $bla_{\text{CTX-M-14}}$; e $bla_{\text{SHV-12}}$); e com resistência a diferentes combinações de antibióticos (estreptomicina, ciprofloxacina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim) e com resistência ao ácido nalidíxico em comum entre todos os isolados.

Segundo a base de dados MLST *Database* da Universidade de Warwick (Coventry, Inglaterra) (mlst.warwick.ac.uk), este ST117 foi previamente identificado em diversas espécies, como aves, gado, humanos, animais de companhia e porcos, em diversos ambientes, incluíndo hospitais e em vários países, como França, Alemanha, Brasil, Espanha e Canadá. Em Portugal, isolados de *Escherichia coli* produtores de ESBL atribuídos ao ST117 foram também identificados e reportados em ambiente hospitalar no ano de 2010 (Rodrigues *et al.* 2015). É de realçar a patogenicidade destes isolados atribuídos ao ST117 e o facto interessante da sua presença ser bastante abrangente, aparecendo tanto em ambiente clínico como em animais selvagens.

Em relação ao ST115, neste estudo foi observada uma associação deste ST a isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-1 obtidos de amostras de javali selvagem e com resistência comum ao antibiótico sulfametoxazol/trimetoprim. De acordo com a base de dados MLST *Database* da Universidade de Warwick, a detecção de isolados com ST115 foi apenas detectada na Alemanha, em aves, frangos de aviário e cães (Ewers *et al.* 2009). Um estudo realizado com isolados obtidos a partir de amostras de aves de aviário no nordeste de Espanha (Catalunha) detectou igualmente estirpes de *Escherichia coli* ST115 também associadas ao grupo filogenético D, contudo produtoras de um tipo distinto de β-lactamase, CMY-2 (Cortés *et al.* 2010).

A estirpe de *E. coli* atribuída ao ST2001, é proveniente de uma amostra de lobo Ibérico e demonstrou produzir dois tipos de β-lactamases distintos, CTX-M-14 e TEM-1 e resistência a quatro antibióticos distintos (estreptomicina, sulfametoxazol/trimetoprim, ácido nalidíxico e tetraciclina). Aparenta ser um ST pouco comum, pois segundo a base de dados MLST *Database* da Universidade de Warwick apenas foi detectado uma vez, numa estirpe patogénica de *E. coli* presente em humano em ambiente hospitalar, no ano de 2006, em Singapura. Igualmente difícil de encontrar na literatura, este ST2001 associado a *Escherichia coli* produtora da β-lactamase SHV-12, foi detectado numa amostra de produção pecuária em Espanha e foi reportada num póster apresentado no Congresso Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas de 2016 (ECCMID) (Alonso *et al.* 2016b).

Por fim, relativamente à estirpe de *Escherichia coli* com o ST69 e complexo clonal 69, este isolado apresentou resistência a aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina e tobramicina), sulfanamidas (sulfametoxazol/trimetoprim), tetraciclina e cloranfenicol, e demonstrou ser produtor de CTX-M-1. De acordo com a base de dados MLST *Database* da Universidade de Warwick, estirpes de *E. coli* com o ST 69 foram observadas em diversos ambientes e em diversas espécies, mas com uma dominância na espécie humana. A detecção de este ST associado a estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL, segundo a base de dados MLST, apenas foi observada em isolados provenientes de amostras ambientais de água de saneamento, tal como num estudo conduzido na Tunísia com o apoio da Universidade de La Rioja (Ben Said *et al.* 2016). Estudos prévios descrevem os isolados de *Escherichia coli* com ST69 como sendo altamente virulentos e com vários genes de resistência a antibióticos, e relatam a sua existência em várias ambientes e várias espécies, inclusive animais selvagens como javalis e macacos na Argélia (Alghoribi *et al.* 2014; Bachiri *et al.* 2016; Muller *et al.* 2016). Em Espanha, a sua identificação também foi bastante comum em ambiente hospitalar e em águas residuais, mas sem qualquer associação a genes beta-lactâmicos (Blanco *et al.* 2011; Colomer-Lluch *et al.* 2013).

Após a terceira fase de análise e selecção de isolados, a quarta e última fase consistiu na determinação da diversidade plasmídica em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL. Foi subdividida em três fases distintas, todas com o mesmo objectivo final, a conjugação e análise da diversidade de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL. Primeiro foi feita uma tentativa de seleccionar os isolados mais propícios a funcionarem como estirpes dadoras para o processo de conjugação. De seguida, foi realizado

o processo de conjugação de estirpes de *Escherichia coli*. Por fim, foi feita a caracterização fenotípica e dos plasmídeos obtidos, tanto nas estirpes dadoras como nas estirpes transconjugantes.

Devido às características genéticas e fenotípicas da estirpe dadora seleccionada, *Escherichia coli* CSH26 (resistente à rifampicina, sem plasmídeos e negativa relativamente à lactose), principalmente o facto ser resistente à rifampicina, obrigou à busca das estirpes dadoras antagonistas, ou seja, as estirpes mais sensíveis a este antibiótico. Esta selecção das estirpes dadoras para o processo de conjugação foi realizado através da medição da concentração média inibitória (CMI) à rifampicina dos 29 isolados previamente seleccionados. Dos 29 isolados que foram submetidos à medição da CMI, todos (100%) prosseguiram para a fase de conjugação, pois demonstraram possuir elevada sensibilidade à rifampicina, algo observado previamente neste tipo de bactérias (Livermore 2012). Numa análise mais aprofundada, 15 isolados foram identificados com uma CMI 25μg/mL (51.7%), em 10 foi observada uma CMI de 12μg/mL (34.5%) e em 4 uma CMI de 6μg/mL (13.8%). É de realçar que a selecção de isolados é exactamente igual à realizada na fase anterior, que contém todas as espécies e combinações de β-lactamases existentes desde o início, informação que foi também sublinhada e realçada na secção de resultados.

Após o processo de conjugação foram obtidas 21 estirpes transconjugantes, o que significa que 21 isolados (72,4%) dadores conseguiram com sucesso transferir a sua informação genética, enquanto 8 isolados (27,6%) não conseguiram formar estirpes transconjugantes.

Associando a produção de β-lactamases com os replicões observados, a maioria dos isolados positivos para $bla_{\text{CTX-M-1}}$ transportaram o replicão IncI1 e IncFIB e, juntamente com os isolados positivos para $bla_{\text{SHV-12}}$, foram os únicos a transportar o replicão IncN. Algo já previamente observado em estudos realizados com diversas espécies e em diversos ambientes (Ben Sallem *et al.* 2014; Garcia-Fernandez *et al.* 2008; Marcade *et al.* 2009). De sublinhar igualmente que os plasmídeos transportados por isolados CTX-M-1 transportaram uma maior variedade de replicões em simultâneo, algo observado também em estudos prévios (Zurfluh *et al.* 2014). As estirpes produtoras de CTX-M-14 foram na sua maioria associadas ao replicão IncK, sendo também as únicas estirpes a transportarem os replicões IncW e IncY. A ligação entre o IncK e o gene $bla_{\text{CTX-M-14}}$ é referida em vários estudos, incluindo um estudo realizado em Espanha com pacientes hospitalares, que sugere que a propagação de estirpes de

Escherichia coli produtoras de esta β-lactamase ocorra devido à disseminação de plasmídeos IncK (Valverde *et al.* 2009). Relativamente às estirpes produtoras de SHV-12, foi observado um perfil de replicões semelhante ao encontrado nas estirpes *bla*$_{\text{CTX-M-1}}$ positivas, com transporte de IncI1 e IncK. Estes resultados vão ao encontro de outros estudos realizados em seres humanos em hospitais em Espanha (Diestra *et al.* 2009). Os isolados produtores da β-lactamase TEM-52, foram associados com os replicões IncK, na sua maioria e com IncI1, e foram também os únicos isolados onde foi observado o replicão IncFIC. Estes replicões foram igualmente associados à propagação de ESBL noutros estudos prévios, inclusive no estudo de lobo Ibérico, onde é frequente o aparecimento do replicão IncK (Bielak *et al.* 2011; Goncalves *et al.* 2012b).

Em relação à experiência de conjugação e às estirpes transconjugantes obtidas, o fenótipo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos foi comprovado para todas as estirpes (100%) através do método da difusão em agar específico para a determinação do fenótipo beta-lactâmico. Relativamente aos 21 transconjugantes e ao seu fenótipo de resistência a outros antibióticos, foram observados cinco fenótipos distintos: quatro estirpes demonstraram ser resistentes apenas ao sulfametoxazol/trimetoprim (19,1), três estirpes provaram resistência à estreptomicina e ao cloranfenicol (14,3%), duas estirpes com resistência apenas ao cloranfenicol (9,5%), uma estirpe com resistência à tetraciclina (4,8) e uma com resistência à estreptomicina (4,8). Sendo assim, do total das estirpes transconjugantes obtidas, 11 (52,4%) adquiriram resistência a pelo menos um antibiótico, enquanto 10 (47,6%) provaram ser sensíveis a todos os antibióticos.

A transferência de genes de resistência entre bactérias, é bastante comum e a transferência de genes associados aos antibióticos previamente reportados foi observada em estudos anteriores. A maioria dos genes de resistência aos antibióticos utilizados hoje em dia são transferíveis através de plasmídeos, entre eles estão os aminoglicosídeos como a estreptomicina, as sulfonamidas como o sulfametoxazol/trimetoprim, as tetraciclinas e o cloranfenicol (van Hoek *et al.* 2011).

Ainda relativamente às estirpes transconjugantes, uma análise aos relicões observados nestas estirpes é necessária. No total das 21 estirpes transconjugantes, foram observados replicões em 17 (81%), enquanto em quatro (19%) estirpes não foi identificado qualquer replicão. Entre todos os perfis plasmídicos observados nas estirpes transconjugantes, os replicões mais comuns foram: IncI1 observado em 13 estirpes, IncB/O identificado em 6

estirpes, o replicão T observado em 4 isolados e o IncP apenas identificado em 3 estirpes transconjugantes. Foram ainda identificados 10 perfis de plasmídeos distintos, existindo portanto três perfis que se repetiram: o perfil constituído por IncI1, IncT e IncB/O foi observado duas vezes, ambas em estirpes CTX-M-1 positivas provenientes de javalis selvagens; o perfil constituído apenas pelo replicão I1 foi identificado seis vezes em diversas espécies produzindo diferentes β-lactamases; e o perfil constituído pelo replicão IncB/O observada em estirpes positivas para CTX-M-14 provenientes de amostras de lince Ibérico.

Resumindo, entre as estirpes dadoras e as estirpes transconjugantes foi observado um elevado nível de transferência do replicão IncI1, o que reforça a ideia de que os plasmídeos IncI1 estão altamente associados a estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL, algo demonstrado em vários estudos (Carattoli 2009; Day *et al.* 2016). Prosseguindo esta análise conclusiva, foi possível observar algumas ligações interessantes entre os fenótipos e a origem das estirpes dadoras e os fenótipos obtidos nas estirpes transconjugantes. Plasmídeos contendo genes beta-lactâmicos $bla_{\text{CTXM-14}}$ e $bla_{\text{TEM-52}}$, após a conjugação, não foi observada qualquer resistência a antibióticos não beta-lactâmicos. Estirpes produtoras de enzimas do tipo SHV-12 foram associadas neste estudo à produção de fenótipos de resistência constituídos por estreptomicina e cloranfenicol nas estirpes transconjugantes, algo que não foi observado em estudos prévios que associam este tipo de β-lactamase com fluoroquinolonas (Canton *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2007).

Outra observação interessante e relevante foi que as estirpes de *Escherichia coli* produtoras de CTX-M-1 provenientes de javali selvagem utilizadas como dadoras, produziram estirpes transconjugantes resistentes ao sulfametoxazol/trimetorpim. As mesmas estirpes de javali selvagem, mas apenas aquelas pertencentes ao grupo filogenético D e com o ST115, produziram estirpes transconjugantes com plasmídeos semelhantes com os replicões IncI1, IncT e IncB/O. Porém, existem estudos que afirmam que a presença de fenótipos multirresistentes entre enterobactérias, são independentes da espécie ou da origem dos isolados (Leverstein-van Hall *et al.* 2003). Por fim foi ainda observada uma associação entre as estirpes transconjugantes com plasmídeos IncB/O e o transporte dos genes beta-lactâmicos $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{CTX-M-14}}$, juntamente com outros genes de resistência. Este facto foi previamente relatado em estirpes de *Escherichia coli* de diversas origens, desde animais para abate como humanos saudáveis, na Suíça (Zurfluh *et al.* 2014).

É relevante sublinhar que, para além de serem capazes de transportar vários genes de resistência aos antibióticos, os plasmídeos transportam também genes de resistência a vários metais pesados, como a prata e o mercúrio, genes que produzem enzimas, factores de virulência que permitem a invasão e a sobrevivência em novos portadores e, inclusive, genes que melhoram a capacidade de reparação de danos no ADN (Bennett 2008). Assim sendo, elementos móveis como os plasmídeos são essenciais para o aparecimento, dispersão e sobrevivência de estirpes multirresistentes como *Escherichia coli* produtora de ESBL.

Conclusões

“I never loose. I either win or learn”

- Nelson Mandela -

Capítulo 6 - Conclusões

Os resultados obtidos e apresentados neste estudo sublinham a já provada existência de estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL em ecossistemas afastados do ser humano, ou isentos de pressões selectivas quanto à resistência aos antibióticos. O aparecimento destas estirpes produtoras de ESBL em animais selvagens pode ser justificada pela crescente proximidade entre estas espécies e o ecossistema do Homem, quer seja na busca de alimento ou devido à invasão do seu *habitat* pelo ser humano.

A importância e a abrangência da problemática em que se insere este estudo, devido aos fundos envolvidos e à elevada taxa de mortalidade, obriga a uma abordagem multidisciplinar, em distintas áreas (medicina humana, medicina veterinária, mista), com formação de profissionais, campanhas de sensibilização e distribuição de informação à população, investigação e vigilância. A análise da resistência aos antibióticos em animais selvagens enquadra-se nesta problemática, devido ao importante papel que estas estirpes possuem como reservatórios de bactérias com genes codificadores de multirresistências.

Neste estudo é aprofundada também a possibilidade de transferência da resistência aos antibióticos entre diferentes ecossistemas (humano, animal e meio ambiente) através do estudo da diversidade de plasmídeos. Estas pequenas moléculas de ADN, denominadas de plasmídeos, têm a capacidade de captar e transportar genes codificadores de resistência aos antibióticos, formando organismos multirresistentes. Assim sendo, como principais conclusões deste estudo podemos referir as seguintes:

1. Elevada diversidade clonal entre isolados de *E. coli* produtores de ESBL, pois dos 53 padrões de PFGE analisados, foram definidos 44 (83%) padrões distintos que apoiam esta conclusão. No entanto, foram observados padrões semelhantes entre isolados de indivíduos da mesma espécie animal.

2. Maior percentagem de estirpes comensais associadas aos grupos filogenéticos B1 e A, percentagem reduzida de isolados associados ao grupo filogenético D e ausência de estirpes patogénicas do grupo filogenético B2. Maior percentagem de estirpes comensais e menor percentagem de estirpes patogénicas, ou seja reduzida patogenicidade.

3. Detecção de quatro distintos STs nos isolados do grupo filogenético D. Três deles, ST117, ST115 e ST69, associados a estirpes altamente virulentas e observados com frequência em ambientes hospitalares. O ST2001 também foi detectado.

4. Associação do ST115 a isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-1 obtidos de amostras fecais de javali selvagem. O isolado de ST69 foi também associado a um isolado produtor de CTX-M-1 mas proveniente de uma amostra fecal de lobo Ibérico.

5. Medição da CMI à rifampicina revelou valores baixos (entre 6µg/mL e 25µg/mL) entre todas as estirpes analisadas, o que reflecte a sensibilidade destes isolados a este antibiótico em particular.

6. Elevada percentagem de conjugação, com 72,4% das estirpes dadoras a formar com sucesso estirpes transconjugantes, reflectindo a preocupante e importante capacidade de transferência de genes de resistência entre as bactérias.

7. Equilíbrio entre as estirpes dadoras quanto aos grupos filogenéticos, com 28,6% dos isolados atribuídos ao grupo D, 33,3% dos isolados atribuídos ao grupo B1 e 38,3% dos isolados atribuídos ao grupo filogenético A.

8. Elevada diversidade plasmídica nas estirpes de *Escherichia coli* dadoras, com 20 perfis de replicões distintos observados. Os replicões mais comuns nas estirpes dadoras foram o IncK e IncI1, enquanto nas estirpes transconjugantes o replicão IncI1 revelou ser o mais comum.

9. Estirpes dadoras produtoras de CTX-M-1 foram associadas aos replicões IncI1 e IncFIB; estirpes dadoras produtoras de CTX-M-14 foram associadas na sua maioria ao replicão IncK; estirpes produtoras de SHV-12 e TEM-52 foram associadas aos replicões IncI1 e IncK.

10. A totalidade das estirpes transconjugantes (100%) demonstrou possuir resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, o que demonstra a transferência dos genes produtores de β-lactamases através de plasmídeos. Relativamente aos antibióticos não beta-lactâmicos, nas estirpes transconjugantes obtidas só foram observadas resistências a quatro antibióticos distintos: sulfametoxazol/trimetoprim, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina.

11. Baixo nível de transferência de genes de resistência a antibióticos não beta-lactâmicos como é visível pela elevada percentagem de estirpes transconjugantes sensíveis a todos os antibióticos testados, 47,6%.

12. Elevado nível de transferência do replicão IncI1, revelando que este tipo de plasmídeos está altamente associado a estirpes de *Escherichia coli* produtoras de ESBL.

13. Plasmídeos que contêm os genes beta-lactâmicos $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{TEM-52}}$, não transportam genes de resistência a antibióticos não beta-lactâmicos.

14. Estirpes produtoras da β-lactamase do tipo SHV-12 foram associadas neste estudo ao transporte de genes de resistência aos antibióticos estreptomicina e cloranfenicol, pois esse fenótipo de resistência foi observado nas estirpes transconjugantes obtidas.

15. Isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-1 provenientes de javali selvagem transportam genes de resistência ao sulfametoxazol/trimetorpim.

16. Isolados de *Escherichia coli* provenientes de javali selvagem com o ST115 revelaram plasmídeos transconjugantes semelhantes com os replicões IncI1, IncT e IncB/O.

17. Plasmídeos com o replicão IncB/O transportam também os genes beta-lactâmicos $bla_{\text{CTX-M-1}}$ e $bla_{\text{CTX-M-14}}$.

A análise realizada neste estudo da diversidade de plasmídeos em estirpes de *Escherichia coli* produtoras de β-lactamases de largo espectro revelou uma grande diversidade de genes beta-lactâmicos e de genes de resistência que podem ser disseminados através destas moléculas de ADN. O estudo realça o importante papel do plasmídeos no desenvolvimento de bactérias multirresistentes, devido à sua capacidade de captar e transportar diferentes genes de resistência aos antibióticos e devido à sua fácil mobilidade entre bactérias. Assim sendo, esta análise demonstra como se desenvolvem as estirpes de *Escherichia coli* multirresistentes e como facilmente se conseguem disseminar na nossa cadeia alimentar, no ambiente e entre o ser humano. É também possível concluir e observar que as espécies de animais selvagens estudadas actuam como reservatórios de bactérias resistentes, e que devido, à sua mobilidade, conseguem disseminar estas bactérias entre outras espécies animais e entre outros ecossistemas.

A utilização abusiva dos antibióticos para tratar infecções não bacterianas ou de forma profiláctica em seres humanos ou como promotores de crescimento em animais atingiu níveis hiperbólicos e, actualmente, enfrentamos um dos mais sérios problemas de saúde pública no mundo. Na União Europeia (UE) estima-se que 25 000 pacientes morram todos os anos devido a problemas causados por infecções bacterianas. Cerca de € 0,9 mil millões são gastos em cuidados de saúde adicionais. Contudo, dados do Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) revelam que o consumo de antibióticos no sul da Europa continua a ser substancialmente mais elevado relativamente ao norte da Europa. Para combater esta tendência foram desenvolvidos planos estratégicos e de acção para reduzir a disseminação da resistência aos antibióticos, pois actualmente este problema começa a ter implicações económicas, sociais e políticas.

O plano estratégico desenvolvido pela UE possui oito objectivos principais: (i) reduzir a mortalidade e os custos associados à resistência aos antibióticos; (ii) promover a criação de planos de acção nacionais para cada país da UE; (iii) promover o uso prudente dos antibióticos e implementar medidas de controlo nas unidades de saúde; (iv) promover a necessidade de abordar a relação existente entre as bactérias multirresistentes e a utilização de antibióticos em medicina humana e veterinária, incluindo a cadeia alimentar; (v) implementar políticas de ensino relativamente ao uso de antibióticos nas universidades e no meio científico, ou seja na formação dos profissionais; (vi) sensibilizar a população para a emergência e disseminação da resistência aos antibióticos; (vii) identificar mecanismos financeiros e de *marketing* inovadores para o desenvolvimento de novos antibióticos; e (viii) criar campanhas de sensibilização e de envolvimento da sociedade.

A criação destes planos de acção demonstra de forma bem clara a importância desta problemática. A agravar esta situação estão os elevados custos para o desenvolvimento de novos fármacos e as reduzidas receitas que resultam da venda de antibióticos, visto ser um tratamento rápido, e estes dois factores juntos desencorajam as grandes farmacêuticas a apostarem nesta área. Prova disso é a inexistência de novas classes de antibióticos contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, nos últimos 30 anos.

É neste sentido que estudos como este são importantes para monitorizar a dispersão das bactérias multirresistentes. Este estudo providencia um breve e útil sumário do estado da disseminação epidemiológica das estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL que colonizam animais selvagens, assim como demonstra quão bem disseminadas estão estas estirpes em

animais selvagens na Península Ibérica. Contudo, é fundamental a monitorização e a investigação nesta área, de forma a analisar a prevalência e a evolução deste tipo de bactérias em diferentes espécies e ambientes, e avaliar as consequências a longo prazo para o ser humano e para as espécies animais.

Referências Bibliográficas

“People talk of situations, read books, repeat quotations, draw conclusions on the wall.”

- Bob Dylan -

Referência Bibliográficas e Leituras Adicionais

Abraham E (1983) History of β-lactam antibiotics. In: Antibiotics. Springer, pp 1-14

Abraham EP, Chain E (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940 Rev Infect Dis 10:677-678

Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA, Upton M (2014) *Galleria mellonella* Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic E. coli PLoS One 9

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments Nat Rev Microbiol 8:251-259 doi:10.1038/nrmicro2312

Allen SE, Janecko N, Pearl DL, Boerlin P, Reid-Smith RJ, Jardine CM (2013) Comparison of *Escherichia coli* recovery and antimicrobial resistance in cecal, colon, and fecal samples collected from wild house mice (*Mus musculus*) J Wildl Dis 49:432-436 doi:10.7589/2012-05-142

Alonso CA, Gonzalez-Barrio D, Tenorio C, Ruiz-Fons F, Torres C (2016a) Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamase Comp Immunol Microbiol Infect Dis 45:34-39 doi:10.1016/j.cimid.2016.02.003

Alonso CA et al. (2016b) Analysis of blaSHV-12-carrying plasmids in *Escherichia coli* from human, animal and food sources. Paper presented at the ECCMID 2016, Amsterdam, Netherlands, 12 April 2016

Alves MS, Pereira A, Araujo SM, Castro BB, Correia AC, Henriques I (2014) Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes Front Microbiol 5:426 doi:10.3389/fmicb.2014.00426

Aminov RI (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature Environ Microbiol 11:2970-2988 doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x

Aminov RI (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future Front Microbiol 1:134 doi:10.3389/fmicb.2010.00134

Arends K, Schiwon K, Sakinc T, Hubner J, Grohmann E (2012) Green fluorescent protein-labeled monitoring tool to quantify conjugative plasmid transfer between Gram-positive and Gram-negative bacteria Appl Environ Microbiol 78:895-899 doi:10.1128/aem.05578-11

Bachiri T, Bakour S, Ladjouzi R, Thongpan L, Rolain JM, Touati A (2016) High rates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in wild boars and Barbary macaques in Algeria J Glob Antimicrob Resist 8:35-40 doi:10.1016/j.jgar.2016.10.005

Baquero F, Alvarez-Ortega C, Martinez JL (2009) Ecology and evolution of antibiotic resistance Environ Microbiol Rep 1:469-476 doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00053.x

Bartoloni A et al. (2009) Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community Int J Antimicrob Agents 33:125-129 doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.07.029

Bassett EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL, Villanueva AR (1980) Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350) Science 209:1532-1534

Ben Said L et al. (2016) Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and pAmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* of water samples in Tunisia Sci Total Environ 550:1103-1109 doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.042

Ben Sallem R et al. (2012) Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:1511-1516 doi:10.1007/s10096-011-1471-z

Ben Sallem R et al. (2014) IncI1 plasmids carrying bla(CTX-M-1) or bla(CMY-2) genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia Microb Drug Resist 20:495-500 doi:10.1089/mdr.2013.0224

Bennett PM (2004) Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews:71-113

Bennett PM (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria British Journal of Pharmacology 153:S347-S357 doi:10.1038/sj.bjp.0707607

Benveniste R, Davies J (1973) Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria Proc Natl Acad Sci U S A 70:2276-2280

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry; W. H. Freeman and Company: New York

Bhullar K et al. (2012) Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome PLoS One 7

Bielak E, Bergenholtz RD, Jorgensen MS, Sorensen SJ, Hansen LH, Hasman H (2011) Investigation of diversity of plasmids carrying the blaTEM-52 gene J Antimicrob Chemother 66:2465-2474 doi:10.1093/jac/dkr331

Bingen E, Picard B, Brahimi N, Mathy S, Desjardins P, Elion J, Denamur E (1998) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains J Infect Dis 177:642-650

Blanco J et al. (2011) National survey of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain J Antimicrob Chemother 66:2011-2021 doi:10.1093/jac/dkr235

Blattner FR et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 science 277:1453-1462

Bradford PA (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat Clin Microbiol Rev 14:933-951, table of contents doi:10.1128/cmr.14.4.933-951.2001

Bradford PA, Dean CR (2008) Resistance of Gram-Negative *Bacilli* to Antimicrobials. In: Fong IW, Drlica K (eds) Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century. Springer US, Boston, MA, pp 97-159. doi:10.1007/978-0-387-72418-8_4

Bronzwaer SL et al. (2002) A European study on the relationship between antimicrobial use and antimicrobial resistance Emerg Infect Dis 8:278-282 doi:10.3201/eid0803.010192

Brooks LE, Field KG (2016) Bayesian meta-analysis to synthesize decay rate constant estimates for common fecal indicator bacteria Water Res 104:262-271 doi:10.1016/j.watres.2016.08.005

Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases Antimicrob Agents Chemother 54:969-976 doi:10.1128/aac.01009-09

Cantas L, Fraser TW, Fjelldal PG, Mayer I, Sorum H (2011) The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) - a comparison of composition and drug resistance BMC Vet Res 7:71 doi:10.1186/1746-6148-7-71

Canton R (2009) Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting Clin Microbiol Infect 15 Suppl 1:20-25 doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x

Canton R, Coque TM (2006) The CTX-M beta-lactamase pandemic Curr Opin Microbiol 9:466-475 doi:10.1016/j.mib.2006.08.011

Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe Clin Microbiol Infect 14 Suppl 1:144-153 doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x

Carattoli A (2001) Importance of integrons in the diffusion of resistance Vet Res 32:243-259 doi:10.1051/vetres:2001122

Carattoli A (2009) Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae* Antimicrob Agents Chemother 53:2227-2238 doi:10.1128/aac.01707-08

Carattoli A (2011) Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids International Journal of Medical Microbiology 301:654-658

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing J Microbiol Methods 63:219-228 doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018

Carballo N, De Antonio-Cusco M, Echeverria-Esnal D, Luque S, Salas E, Grau S (2017) Community-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critically-ill patients: systematic review Farm Hosp 41:187-203 doi:10.7399/fh.2017.41.2.10591

Carroll D, Wang J, Fanning S, McMahon BJ (2015) Antimicrobial Resistance in Wildlife: Implications for Public Health Zoonoses Public Health 62:534-542 doi:10.1111/zph.12182

Carson M, Meredith AL, Shaw DJ, Giotis ES, Lloyd DH, Loeffler A (2012) Foxes as a potential wildlife reservoir for mecA-positive *Staphylococci* Vector Borne Zoonotic Dis 12:583-587 doi:10.1089/vbz.2011.0825

Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, Sanders AG (2005) THE CLASSIC: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940 Clin Orthop Relat Res 439:23-26

Charlebois RL (1999) Organization of the prokaryotic genome. ASM Press,

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group Appl Environ Microbiol 66:4555-4558

Clermont O, Christenson JK, Daubie AS, Gordon DM, Denamur E (2014) Development of an allele-specific PCR for *Escherichia coli* B2 sub-typing, a rapid and easy to perform substitute of multilocus sequence typing J Microbiol Methods 101:24-27 doi:10.1016/j.mimet.2014.03.008

Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups Environ Microbiol Rep 5:58-65 doi:10.1111/1758-2229.12019

Clermont O, Gordon D, Denamur E (2015) Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes Microbiology 161:980-988

CLSI CLSI (2014) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty fourth informational supplement M100-S24 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

Colomer-Lluch M et al. (2013) Detection of quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates belonging to clonal groups O25b:H4-B2-ST131 and O25b:H4-D-ST69 in raw sewage and river water in Barcelona, Spain J Antimicrob Chemother 68:758-765 doi:10.1093/jac/dks477

Cook M, Molto E, Anderson C (1989) Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt Am J Phys Anthropol 80:137-143 doi:10.1002/ajpa.1330800202

Correia S et al. (2012) High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* isolates among hemodialysis patients in Portugal: appearance of ST410 with the bla(CTX-M-14) gene Diagn Microbiol Infect Dis 74:423-425 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.017

Cortés P et al. (2010) Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Strains from Chicken and Pig Farms in Spain Appl Environ Microbiol 76:2799-2805

Costa D et al. (2008) Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals Microb Drug Resist 14:71-77 doi:10.1089/mdr.2008.0795

Costa D et al. (2006) Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal J Antimicrob Chemother 58:1311-1312 doi:10.1093/jac/dkl415

Criswell D (2004) The" Evolution" of Antibiotic Resistance. Institute for Creation Research,

D'Costa VM et al. (2011) Antibiotic resistance is ancient Nature 477:457-461 doi:10.1038/nature10388

D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD (2006) Sampling the antibiotic resistome Science 311:374-377 doi:10.1126/science.1120800

D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis BMJ 324:1361

Datta N, Kontomichalou P (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae* Nature 208:239-241

Davison J (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment Plasmid 42:73-91 doi:10.1006/plas.1999.1421

Day MJ et al. (2016) Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK J Antimicrob Chemother 71:1178-1182 doi:10.1093/jac/dkv485

de la Cruz F, Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria Trends Microbiol 8:128-133

Diestra K et al. (2009) Characterization of plasmids encoding blaESBL and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* J Antimicrob Chemother 63:60-66 doi:10.1093/jac/dkn453

Domagk G (1935) Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift 61:250-253

Du Bois SK, Marriott MS, Amyes SG (1995) TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function J Antimicrob Chemother 35:7-22

ECDC E (2009) The bacterial challenge: time to react Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control

Ehrlich P, Halta S (1910) Die experimentelle chemotherapie der Spirillosen vol 8. Springer,

Emmerich R, Löw O (1899) Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infectionskrankheiten durch dieselben Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 31:1-65 doi:10.1007/bf02206499

Ewers C, Antão E-M, Diehl I, Philipp H-C, Wieler LH (2009) Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential Applied and Environmental Microbiology 75:184-192

Falkinham JO, 3rd, Wall TE, Tanner JR, Tawaha K, Alali FQ, Li C, Oberlies NH (2009) Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils Appl Environ Microbiol 75:2735-2741 doi:10.1128/aem.00104-09

Fevre C, Jbel M, Passet V, Weill FX, Grimont PA, Brisse S (2005) Six groups of the OXY beta-Lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca* Antimicrob Agents Chemother 49:3453-3462 doi:10.1128/aac.49.8.3453-3462.2005

Fleming A (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* British journal of experimental pathology 10:226

Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, Selleck EM, Sommer MO, Dantas G (2012) The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens Science 337:1107-1111 doi:10.1126/science.1220761

Friedmann HC (2014) Escherich and *Escherichia* EcoSal Plus 6 doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0025-2013

Frost LS (1992) Bacterial conjugation: everybody's doin' it Can J Microbiol 38:1091-1096

Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, Carattoli A (2008) Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin J Antimicrob Chemother 61:1229-1233 doi:10.1093/jac/dkn131

Gardner P, Smith DH, Beer H, Moellering RC, Jr. (1969) Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community Lancet 2:774-776

Gautom RK (1997) Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day J Clin Microbiol 35:2977-2980

Goncalves A et al. (2013) Antimicrobial resistance in faecal enterococci and *Escherichia coli* isolates recovered from Iberian wolf Lett Appl Microbiol 56:268-274 doi:10.1111/lam.12044

Goncalves A et al. (2012a) Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of Iberian lynx Lett Appl Microbiol 54:73-77 doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03173.x

Goncalves A et al. (2012b) Iberian wolf as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* of the TEM, SHV, and CTX-M groups Microb Drug Resist 18:215-219 doi:10.1089/mdr.2011.0145

Goncalves A et al. (2010) Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm Foodborne Pathog Dis 7:1569-1573 doi:10.1089/fpd.2010.0598

Goossens H (2009) Antibiotic consumption and link to resistance Clin Microbiol Infect 15 Suppl 3:12-15 doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02725.x

Griffith LJ (1966) Development of resistance to kanamycin Annals of the New York Academy of Sciences 132:796-799

Gutiérrez-Ríos R, Rosenblueth DA, Loza Jé A, Huerta AM, Glasner JD, Blattner FR, Collado-Vides J (2003) Regulatory Network of *Escherichia coli:* Consistency Between Literature Knowledge and Microarray Profiles Genome Res 13:2435-2443

Hasan B, Laurell K, Rakib MM, Ahlstedt E, Hernandez J, Caceres M, Jarhult JD (2016) Fecal Carriage of Extended-Spectrum beta-Lactamases in Healthy Humans, Poultry, and Wild Birds in Leon, Nicaragua-A Shared Pool of blaCTX-M Genes and Possible Interspecies Clonal Spread of Extended-Spectrum beta-Lactamases-Producing *Escherichia coli* Microb Drug Resist 22:682-687 doi:10.1089/mdr.2015.0323

Hays EE et al. (1945) Antibiotic Subtances Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* Journal of Biological Chemistry 159:725-750

Herzer PJ, Inouye S, Inouye M, Whittam TS (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli* J Bacteriol 172:6175-6181

Heuer H, Schmitt H, Smalla K (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields Curr Opin Microbiol 14:236-243 doi:10.1016/j.mib.2011.04.009

Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids Anal Biochem 114:193-197

Hume M (2011) Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics Poultry science 90:2663-2669

Jacobs C, Huang LJ, Bartowsky E, Normark S, Park JT (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction EMBO J 13:4684-4694

Jacoby GA (1997) Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams Infect Dis Clin North Am 11:875-887

Johnson JK et al. (2017) Carbapenem Minimal Inhibitory Concentrations in *Escherichia coli* and *Klebsiella* species producing Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBLs) in Critical Care Patients from 2001-2009 Antimicrob Agents Chemother doi:10.1128/aac.01718-16

Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, Nolan LK (2007) Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates Appl Environ Microbiol 73:1976-1983 doi:10.1128/aem.02171-06

Keyes K, Lee MD, Maurer JJ (2008) Antibiotics: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Transfer. In: Microbial Food Safety in Animal Agriculture. Blackwell Publishing, pp 45-56. doi:10.1002/9780470752616.ch6

Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PA, Graham DW (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940 Environ Sci Technol 44:580-587 doi:10.1021/es901221x

Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* Infection 11:315-317

Kollek R, Oertel W, Goebel W (1978) Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1 Mol Gen Genet 162:51-57

Kruse H, Sørum H (1994) Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments Applied and Environmental Microbiology 60:4015-4021

Lau CSM, Chamberlain RS (2016) Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis Int J Gen Med 9:27-37

Lawrence JG, Ochman H (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome Proc Natl Acad Sci U S A 95:9413-9417

Leverstein-van Hall MA, HE MB, AR TD, Paauw A, Fluit AC, Verhoef J (2003) Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin J Infect Dis 187:251-259 doi:10.1086/345880

Levy SB (2002) The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative power. Perseus Pub., Cambridge, MA

Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses Nat Med 10:S122-129 doi:10.1038/nm1145

Lewis K (2013) Platforms for antibiotic discovery Nat Rev Drug Discov 12:371-387 doi:10.1038/nrd3975

Livermore DM (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance Clin Microbiol Rev 8:557-584

Livermore DM (2012) Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens Korean J Intern Med 27:128-142 doi:10.3904/kjim.2012.27.2.128

Livermore DM et al. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe J Antimicrob Chemother 59:165-174 doi:10.1093/jac/dkl483

Machado E, Coque TM, Canton R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, Peixe L (2007) High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal J Antimicrob Chemother 60:1370-1374 doi:10.1093/jac/dkm381

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997) Brock biology of microorganisms vol 11. prentice hall Upper Saddle River, NJ,

Marcade G et al. (2009) Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases J Antimicrob Chemother 63:67-71 doi:10.1093/jac/dkn428

Marinho C et al. (2014) Azorean wild rabbits as reservoirs of antimicrobial resistant *Escherichia coli* Anaerobe 30:116-119 doi:10.1016/j.anaerobe.2014.09.009

Marinho CM, Santos T, Goncalves A, Poeta P, Igrejas G (2016) A Decade-Long Commitment to Antimicrobial Resistance Surveillance in Portugal Front Microbiol 7:1650 doi:10.3389/fmicb.2016.01650

Martinez JL (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants Environ Pollut 157:2893-2902 doi:10.1016/j.envpol.2009.05.051

Martinez JL (2012) Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials Front Microbiol 3:1 doi:10.3389/fmicb.2012.00001

Martinez JL, Sanchez MB, Martinez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems FEMS Microbiol Rev 33:430-449 doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x

Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y (1988) Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins Antimicrob Agents Chemother 32:1243-1246

McArthur AG, Wright GD (2015) Bioinformatics of antimicrobial resistance in the age of molecular epidemiology Curr Opin Microbiol 27:45-50 doi:10.1016/j.mib.2015.07.004

McEwen SA, Fedorka-Cray PJ (2002) Antimicrobial use and resistance in animals Clin Infect Dis 34 Suppl 3:S93-S106 doi:10.1086/340246

McFarland J (1907) The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines Journal of the American Medical Association 49:1176-1178

McKenna J, McKenna J (1998) Natural alternatives to antibiotics. Avery Pub. Group, Garden City Park, N.Y.

Medeiros AA (1984) Beta-lactamases Br Med Bull 40:18-27

Muller A, Stephan R, Nuesch-Inderbinen M (2016) Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans Sci Total Environ 541:667-672 doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.135

Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ (2010) Brief communication: Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE Am J Phys Anthropol 143:151-154 doi:10.1002/ajpa.21340

Nordstrom K (2006) Plasmid R1--replication and its control Plasmid 55:1-26 doi:10.1016/j.plasmid.2005.07.002

Norman A, Hansen LH, Sørensen Sø J (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364:2275-2289

Novick RP (1987) Plasmid incompatibility Microbiol Rev 51:381-395

Olofsson TC, Butler È, Markowicz P, Lindholm C, Larsson L, Vásquez A (2016) Lactic acid bacterial symbionts in honeybees – an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities International Wound Journal 13:668-679 doi:10.1111/iwj.12345

Orskov F, Orskov I (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals Can J Microbiol 38:699-704

Osterblad M, Norrdahl K, Korpimaki E, Huovinen P (2001) Antibiotic resistance. How wild are wild mammals? Nature 409:37-38 doi:10.1038/35051173

Pallecchi L et al. (2007) Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure Antimicrob Agents Chemother 51:1179-1184 doi:10.1128/aac.01101-06

Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update Clin Microbiol Rev 18:657-686 doi:10.1128/cmr.18.4.657-686.2005

Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA (2003) Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases Antimicrob Agents Chemother 47:3554-3560

Perry JA, Westman EL, Wright GD (2014) The antibiotic resistome: what's new? Curr Opin Microbiol 21:45-50 doi:10.1016/j.mib.2014.09.002

Pierce B (2002) Genetics: A Conceptual Approach. W. H. Freeman,

Pinto L et al. (2010) Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal Appl Environ Microbiol 76:4118-4120 doi:10.1128/aem.02761-09

Pitout JD (2010) Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices Drugs 70:313-333 doi:10.2165/11533040-000000000-00000

Poeta P, Coelho AC, Rodriges J (2008) Manual de Aulas Práticas de Microbiologia Aplicada à Saúde. Série Didáctica nº340. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real

Poeta P et al. (2009) Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups J Basic Microbiol 49:584-588 doi:10.1002/jobm.200900066

Prescott JF, Dowling PM (2013) Antimicrobial therapy in veterinary medicine. John Wiley & Sons,

Radhouani H, Igrejas G, Goncalves A, Estepa V, Sargo R, Torres C, Poeta P (2013a) Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from red foxes in Portugal Arch Microbiol 195:141-144 doi:10.1007/s00203-012-0853-7

Radhouani H et al. (2013b) Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and *enterococci* from red foxes (*Vulpes vulpes*) Anaerobe 23:82-86 doi:10.1016/j.anaerobe.2013.06.013

Radhouani H, Poeta P, Igrejas G, Goncalves A, Vinue L, Torres C (2009) Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve Vet Rec 165:138-142

Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet Foodborne Pathog Dis 3:59-67 doi:10.1089/fpd.2006.3.59

Roca I et al. (2015) The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention New Microbes New Infect 6:22-29 doi:10.1016/j.nmni.2015.02.007

Rodrigues C, Machado E, Peixe L, Novais A (2013) IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries J Antimicrob Chemother 68:2245-2248 doi:10.1093/jac/dkt187

Rodrigues C, Machado E, Pires J, Ramos H, Novais A, Peixe L (2015) Increase of widespread A, B1 and D *Escherichia coli* clones producing a high diversity of CTX-M-types in a Portuguese hospital Future Microbiol 10:1125-1131 doi:10.2217/fmb.15.38

Rodríguez-Angeles G (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* salud pública de méxico 44:464-475

Rohde CL, Bartolini V, Jones N (2009) The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile*–associated diarrhea Nutrition in Clinical Practice 24:33-40

Saavedra JM (2007) Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects Nutrition in clinical practice 22:351-365

Saenz Y, Brinas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C (2004) Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins Antimicrob Agents Chemother 48:3996-4001 doi:10.1128/aac.48.10.3996-4001.2004

Sasaki Y, Goshima T, Mori T, Murakami M, Haruna M, Ito K, Yamada Y (2013) Prevalence and antimicrobial susceptibility of foodborne bacteria in wild boars (*Sus scrofa*) and wild deer (*Cervus nippon*) in Japan Foodborne Pathog Dis 10:985-991 doi:10.1089/fpd.2013.1548

Scarano C et al. (2014) Antibiotic resistance of *Vibrio* species isolated from *Sparus aurata* reared in Italian mariculture New Microbiol 37:329-337

Schillaci D, Arizza V (2013) Echinoderm antimicrobial peptides to contrast human pathogens Natural Products Chemistry & Research

Schroeder M, Brooks BD, Brooks AE (2017) The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance Genes (Basel) 8 doi:10.3390/genes8010039

Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature Front Microbiol 4

Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA (2001) Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon Appl Environ Microbiol 67:561-568 doi:10.1128/aem.67.2.561-568.2001

Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH (2007) Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? Clinical Infectious Diseases 45:1025-1029 doi:10.1086/521946

Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences Nucleic Acids Res 34:D32-36 doi:10.1093/nar/gkj014

Silva N et al. (2011) Molecular characterization of vancomycin-resistant *enterococci* and extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago Avian Pathol 40:473-479 doi:10.1080/03079457.2011.599061

Sirot D et al. (1987) Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase J Antimicrob Chemother 20:323-334

Skaare D et al. (2014) Multilocus sequence typing and ftsI sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* BMC microbiology 14:131

Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P (1988) Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes Rev Infect Dis 10:879-884

Sousa M et al. (2014) Acquired antibiotic resistance among wild animals: the case of Iberian Lynx (*Lynx pardinus*) Vet Q 34:105-112 doi:10.1080/01652176.2014.949391

Sousa M, Torres C, Barros J, Somalo S, Igrejas G, Poeta P (2011) Gilthead seabream (*Sparus aurata*) as carriers of SHV-12 and TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases-containing *Escherichia coli* isolates Foodborne Pathog Dis 8:1139-1141 doi:10.1089/fpd.2011.0866

Stewart JR et al. (2014) Survey of antibiotic-resistant bacteria isolated from bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the southeastern USA Dis Aquat Organ 108:91-102 doi:10.3354/dao02705

Stokstad E, Jukes T (1950) Growth-promoting effect of aureomycin on turkey poults Poultry Science 29:611-612

Stokstad EL, Jukes TH, et al. (1949) The multiple nature of the animal protein factor J Biol Chem 180:647-654

Szmolka A, Nagy B (2013) Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health Front Microbiol 4:258 doi:10.3389/fmicb.2013.00258

Tacconelli E et al. (2014) ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients Clin Microbiol Infect 20 Suppl 1:1-55 doi:10.1111/1469-0691.12427

Tartof SY, Solberg OD, Manges AR, Riley LW (2005) Analysis of a Uropathogenic *Escherichia coli* Clonal Group by *Multilocus* Sequence Typing J Clin Microbiol 43:5860-5864

Tatum EL, Lederberg J (1947) Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli* J Bacteriol 53:673-684

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing J Clin Microbiol 33:2233-2239

Torres C (2012) La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming.

Torres C, Zarazaga M (2002) [Antibiotics as growth promoters in animals. Are we going down the right road?] Gac Sanit 16:109-112

Touchon M et al. (2009) Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths PLoS Genet 5:e1000344 doi:10.1371/journal.pgen.1000344

Trieu-Cuot P, Carlier C, Martin P, Courvalin P (1987) Plasmid transfer by conjugation from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria FEMS Microbiology Letters 48:289-294

Valverde A et al. (2009) Spread of bla(CTX-M-14) is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain Antimicrob Agents Chemother 53:5204-5212 doi:10.1128/aac.01706-08

van den Bogaard AE, Stobberingh EE (2000) Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans Int J Antimicrob Agents 14:327-335

van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT (2011) Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects ISME J 5:173-183 doi:10.1038/ismej.2010.80

van Hoek A, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM (2011) Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview Front Microbiol 2

Ventola CL (2015) The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats P T 40:277-283

Wellington EM et al. (2013) The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria Lancet Infect Dis 13:155-165 doi:10.1016/s1473-3099(12)70317-1

WHO WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.

Wirth T et al. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective Mol Microbiol 60:1136-1151 doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x

Wong RW, Hagg U, Samaranayake L, Yuen MK, Seneviratne CJ, Kao R (2010) Antimicrobial activity of Chinese medicine herbs against common bacteria in oral biofilm. A pilot study Int J Oral Maxillofac Surg 39:599-605 doi:10.1016/j.ijom.2010.02.024

Wright GD (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity Nat Rev Microbiol 5:175-186 doi:10.1038/nrmicro1614

Wright GD (2010a) The antibiotic resistome Expert Opin Drug Discov 5:779-788 doi:10.1517/17460441.2010.497535

Wright GD (2010b) Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? BMC Biol 8:123 doi:10.1186/1741-7007-8-123

Zouiten A et al. (2017) Designation of pathogenic resistant bacteria in the *Sparus aurata* sea collected in Tunisia coastlines: Correlation with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of antibiotics Microb Pathog doi:10.1016/j.micpath.2017.01.004

Zurfluh K, Jakobi G, Stephan R, Hachler H, Nuesch-Inderbinen M (2014) Replicon typing of plasmids carrying bla CTX-M-1 in *Enterobacteriaceae* of animal, environmental and human origin Front Microbiol 5:555 doi:10.3389/fmicb.2014.00555

Anexos

“If you don´t love something, you’re not going to go the extra mile, work the extra weekend, challenge the status quo as much.”

- Steve Jobs -

Anexos

A. Meios de Cultura

Meios de cultura utilizados no decorrer deste estudo:

Meio de cultura	Descrição	Quantidade	Composição
Brain-Heart Infusion (BHI)	Meio nutritivo utilizado para o crescimento de bactérias	52 g/L	▪Cérebro de vitelo – 7,7 g/L ▪Coração de vaca – 9,8 g/L ▪Protease peptona – 10 g/L ▪Dextrosa – 2 g/L ▪Cloreto de sódio – 5 g/L ▪Fosfato disódico – 2,5 g/L ▪Agar – 15 g/L ▪pH 7.4 ± 0.2
Mueller-Hinton Agar (MH)	Meio utilizado para o estudo da sensibilidade aos antibióticos	38 g/L	▪Infusão desidratada de carne de vitelo – 2 g/L ▪Hidrolisado de caseína – 17,5 g/L ▪Amido – 1,5 g/L ▪Agar – 17 g/L ▪pH 7.3 ± 0.1
Luria-Bertani (LB)	Meio utilizado para manutenção e crescimento de *Escherichia coli*	25 g/L	▪Peptona – 10 g/L ▪Extracto de levedura – 5 g/L ▪Cloreto de sódio – 10 g/L ▪pH 7.0
Meio de leite (Skim Milk)	Meio utilizado para conservar os isolados a temperaturas de congelação (-80ºC)	100 g/L	▪Leito desnatado, desidratado utilizado a 10% e dissoluto em água esterilizada e desionizada

B. Soluções Tampão

Soluções tampão utilizados durante o estudo para a realização de PCR e PFGE:

Tampão	Componentes	Concentração	Quantidade
TBE 5x	▪Tris-base	--	54 g/L
	▪Ácido bórico	--	27,5 g/L
	▪EDTA pH 8	0,5M	20 mL/L
Tampão SE (PFGE)	▪NaCl	5M	1,5mL
	▪EDTA pH 8	0,5M	5 mL
	▪Água esterilizada	--	93,5 mL
Tampão Lise (PFGE)	▪Tris	1M	5 mL
	▪EDTA pH 8	0,5M	10 mL
	▪Água esterilizada	--	80 mL
	▪Sarcosil	20%	5 mL
	▪Proteinase pH 8	--	0,01 g
Tampão TE (PFGE)	▪Tris	1M	10 mL
	▪EDTA pH 8	0,5M	2 mL
	▪Água esterilizada	--	988

C. Calendarização PFGE

Calendarização utilizada para a realização do protocolo de PFGE:

Dia da semana	**SEGUNDA-FEIRA**	**TERÇA-FEIRA**	**QUARTA-FEIRA**	**QUINTA-FEIRA**	**SEXTA-FEIRA**
Tarefas a realizar	▪Descongelar as amostras do meio de leite o mínimo possível; ▪Semear por esgotamento em meio de agar BHI; ▪Preparar todos os tampões a serem utilizados.	▪Após 24 horas a 37ºC em estufa, retirar as placas com meio BHI; ▪Com o auxílio de uma ansa, retirar apenas uma colónia e semear numa nova placa com meio BHI, por estria.	▪Preparação dos insertos; ▪Proteólise bacteriana.	▪Lavagem dos insertos; ▪Digestão enzimática; ▪Preparação do gel de agarose; ▪Início da da electroforese.	▪Coloração do gel e visualização; ▪Análise dos padrões de PFGE.