



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PLASMÍDEOS RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA A
QUINOLONAS EM
Escherichia coli

por
Gonçalo Nuno Barroca de Macedo

Outubro 2013



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

GENETIC CHARACTERIZATION OF PLASMIDS ASSOCIATED WITH QUINOLONE RESISTANCE
IN *Escherichia coli*

by
Gonçalo Nuno Barroca de Macedo

October 2013



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PLASMÍDEOS RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA A
QUINOLONAS EM
Escherichia coli

GENETIC CHARACTERIZATION OF PLASMIDS ASSOCIATED WITH QUINOLONE RESISTANCE
IN
Escherichia coli

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Aplicada

por
Gonçalo Nuno Barroca de Macedo

Local: Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Prof. Doutora Célia Manaia

Outubro 2013



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
Escola Superior de Biotecnologia

GENETIC CHARACTERIZATION OF PLASMIDS ASSOCIATED WITH QUINOLONE RESISTANCE
IN
Escherichia coli

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PLASMÍDEOS RELACIONADOS COM A RESISTÊNCIA A
QUINOLONAS EM
Escherichia coli

Thesis presented to *School of Biotechnology* of the *Portuguese Catholic University* to fulfill the
requirements of Master of Science degree in Applied Microbiology

by
Gonçalo Nuno Barroca de Macedo

Place: Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa

Supervision: Prof. Doutora Célia Manaia

October 2013

Resumo

As águas residuais e alguns cursos de água representam importantes reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos e dos seus genes, uma vez que recebem bactérias comensais e patogénicas de origem humana e animal. Por esse motivo, a água constitui um importante veículo de disseminação de bactérias de origem fecal, como por exemplo *Escherichia coli*, principalmente em ambientes urbanos. A prevalência de resistência a beta-lactâmicos e a quinolonas tem vindo a aumentar em *E. coli*, possivelmente devido a processos de transferência horizontal de genes. Muitos dos genes que conferem resistência a estes antibióticos estão localizados em plasmídeos, em particular nos plasmídeos do grupo de incompatibilidade F (incF). Neste estudo, 11 isolados de *Escherichia* spp. resistentes a ciprofloxacina, foram caracterizados com o intuito de compreender os mecanismos utilizados na dispersão de resistência a quinolonas. As estirpes estudadas, nove *E. coli* e duas *E. fergusonii*, foram isoladas de águas residuais municipais e de efluente hospitalar. A pesquisa de determinantes genéticos de resistência a quinolonas, a beta-lactâmicos e de integrões, revelou a presença dos genes *aac(6')-Ib-cr* (n=4), *qepA* (n=2) e *qnrS* (n=1), *bla_{TEM}* (n=6), *bla_{OXA}* (n=3), *ampC* (n=11) e integrões de classe 1 (n=10). Não foram detectados os determinantes genéticos *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *bla_{CTX}* nem *bla_{SHV}*, também pesquisados. A caracterização dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos permitiu concluir que todos os isolados possuíam plasmídeos incF e ainda incI1 (n=2), incN (n=2), incY (n=2), IncA/C (n=2), incK (n=2) e incB/O (n=3). Após ensaios de transformação com a estirpe *E. coli* Top10 como receptora, houve aquisição de plasmídeos incF a partir de duas estirpes dadoras, e dos genes *aac(6')-Ib-cr* (1/2), *qnrS* (1/2), *bla_{TEM}* (1/2) e *ampC* (2/2). A caracterização por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) das replicões dos plasmídeos incF permitiu identificar sete genótipos distintos. Este trabalho sugere uma elevada diversidade de plasmídeos em estirpes de *Escherichia* provenientes de efluentes municipais ou hospitalares e que podem estar associados à disseminação de resistência a quinolonas e beta-lactâmicos. Estudos futuros ajudarão a compreender quais os factores ambientais que podem potenciar a transferência destes plasmídeos para outras bactérias no ambiente.

Abstract

Wastewater and some surface water bodies represent important reservoirs of resistant bacteria and of antibiotic resistance genes, for example of the genus *Escherichia*, mainly in urban environments. In recent years, beta-lactam- and quinolone-resistant *E. coli* has been increasing due to horizontal gene transfer and several genes associated with these resistance types are known to be located in plasmids, in particular in plasmids belonging to incompatibility group F (incF). In this study, 11 ciprofloxacin-resistant *Escherichia* spp. isolates were characterized in order to get additional insights about the modes of dispersion of quinolone resistance. The strains studied, nine *E. coli* and two *E. fergusonii*, were isolated from municipal and hospital wastewater. The screening of resistance genetic determinants to quinolones, beta-lactams and integrons revealed the presence of the genes *aac(6')-Ib-cr* (n=4), *qepA* (n=2) and *qnrS* (n=1), *bla_{TEM}* (n=6), *bla_{OXA}* (n=3), *ampC* (n=11) and class 1 integrons (n=10). Other resistance genetic determinants such as *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *bla_{CTX}* and *bla_{SHV}*, also screened in this study, were not found. Incompatibility group characterization allowed not only the detection of incF plasmids in all isolates, but also inc11 (n=2), incN (n=2), incY (n=2), IncA/C (n=2), incK (n=2) and incB/O (n=3). After transformation assays, using reference strain *E. coli* Top10 as recipient, incF plasmids were acquired from two donor strains, as well as genes *aac(6')-Ib-cr* (1/2), *qnrS* (1/2), *bla_{TEM}* (1/2) and *ampC* (2/2). *Multilocus Sequence Typing* (MLST) of incF replicons revealed seven distinct genotypes. This work suggests high plasmid diversity among *Escherichia* spp. strains from municipal or hospital wastewater and that they may be linked to quinolone and beta-lactam resistance dissemination. Future studies will help perceive which environmental factors can enhance the transfer of these plasmids to other bacteria.

Índice

Resumo.....	pág. 9
Abstract.....	pág. 11
Lista de figuras.....	pág. 15
Lista de tabelas.....	pág. 17
1. Introdução	
Águas Residuais e Estações de Tratamento de Águas.....	pág. 19
O género <i>Escherichia</i>	pág. 19
A Resistência a Quinolonas.....	pág. 20
A Resistência a Beta-lactâmicos.....	pág. 21
Os Plasmídeos como Veículo de Transmissão de Genes.....	pág. 22
Classificação dos Plasmídeos com base nos Grupos de Incompatibilidade.....	pág. 23
Objetivo do Estudo e Plano de Trabalho.....	pág. 25
2. Materiais e Métodos	
Isolados Bacterianos.....	pág. 27
Extração de DNA.....	pág. 27
Caracterização Genotípica dos Isolados.....	pág. 28
Perfis de Resistência a Antibióticos.....	pág. 29
Caracterização dos Grupos de Incompatibilidade dos Plasmídeos.....	pág. 29
Tratamento dos Extratos de DNA com Plasmid-Safe.....	pág. 31
Pesquisa de Determinantes Genéticos Associados à Resistência a Antibióticos...pág. 31	
Preparação de Células Competentes e Transformação com DNA Plasmídico.....	pág. 32

Replicon Sequence Typing.....pág. 33

3. Resultados e Discussão

Identificação e Caracterização dos Isolados.....pág. 35

Determinação dos Grupos de Incompatibilidade dos Plasmídeos.....pág. 37

Pesquisa de Determinantes Genéticos Associados à Resistência a Antimicrobianos.....pág. 37

Pesquisa e Caracterização de Integrões.....pág. 38

Isolamento e Purificação de Plasmídeos.....pág. 40

Replicon Sequence Typing.....pág. 42

4. Conclusões Gerais.....pág. 45

5. Trabalho Futuro.....pág. 47

6. Bibliografia.....pág. 49

Lista de Figuras

Figura 1.1 – Estrutura molecular da Ciprofloxacina, uma fluoroquinolona. Retirado de Wikipedia.org.....pág. 20

Figura 1.2 – Estrutura geral de um integrão. As setas indicam a direção da transcrição. Adaptado de Levesque et al. (1995).....pág. 22

Figura 3.1 – Exemplo de um resultado obtido por PCR multiplex dos grupos de incompatibilidade. Poço 1 = marcador (100 bp); poço 2 = Controlo positivo FIA (462 bp); poço 3 = Controlo positivo FIB (702 bp); poço 4 = Controlo positivo W (242 bp); poço 5 = H1FC53; poço 6 = SA4FC36A; poço 7 = SA4FC77; poço 8 = Branco.....pág. 37

Lista de Tabelas

- Tabela 1.1** – Famílias de plasmídeos associadas à presença de genes plasmídicos de resistência a quinolonas em *Enterobacteriaceae* (Carattoli, 2009).....pág. 24
- Tabela 2.1** – Características dos isolados em estudo.....pág. 27
- Tabela 2.2** – Primers usados para caracterização dos grupos de incompatibilidade. Adaptado de Carattoli et al. (2005).....pág. 30
- Tabela 2.3** - Genes pesquisados e primers usados para detecção de determinantes genéticos associados à resistência a antibióticos.....pág. 31
- Tabela 3.1** – Características dos isolados em estudo.....pág. 36
- Tabela 3.2** –Determinantes genéticos pesquisados.....pág. 39
- Tabela 3.3** – Tabela resumo do resultado do antibiograma e dos genes detetados nas bactérias *E. coli* Top10 transformadas.....pág. 41
- Tabela 3.4** – Resultados obtidos RST do grupo IncF (fórmula FAB). Estão representados, o local de isolamento, as características de cada isolado (individuais e comuns entre isolados de cada perfil FAB), a estirpe de origem do plasmídeo com o mesmo perfil FAB publicada no GenBank e a sua referência. Adaptado de Villa et al. (2010).....pág. 43

1. Introdução

Águas Residuais e Estações de Tratamento de Águas

As águas residuais e os cursos de água têm particular interesse no estudo de bactérias resistentes a antibióticos. Estes ambientes aquáticos representam um importante reservatório de bactérias e de genes de resistência a antibióticos uma vez que são recetores de microbiota, comensal e patogénica, humana e animal, constituindo um importante veículo de disseminação de *Escherichia coli* no ambiente urbano. Devido à descarga para os esgotos e cursos de água, de bactérias de origem humana e animal, bem como de resíduos de agentes antimicrobianos e outros micropoluentes, a água representa um meio privilegiado de dispersão de resistência a antibióticos (Manaia et al., 2012; Rizzo et al., 2013). Em particular, as Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), onde são libertados agentes antimicrobianos que não são totalmente metabolizados por humanos e animais, têm sido referidas como importantes focos para a evolução da resistência (Cantas et al., 2013; Michael et al., 2013). De facto, a disseminação de resistência a antibióticos no ambiente a partir das ETARs tem sido amplamente discutido (Michael et al., 2013; Rizzo et al., 2013).

O género *Escherichia*

O género *Escherichia*, integrado na família *Enterobacteriaceae* contém sete espécies, das quais a mais conhecida é a *Escherichia coli*. Estas bactérias possuem a forma de bastonete, coram de Gram-negativo, são anaeróbias facultativas e fermentam lactose. A espécie *E. coli* é comumente encontrada no intestino de mamíferos e aves, mas é-lhe reconhecida uma certa ubiquidade, conseguindo sobreviver no ambiente, nomeadamente em cursos de água. De facto, a presença/ausência de *E. coli* é um indicador de contaminação fecal e tem sido usada para determinação da qualidade de águas (Decreto-Lei 236/98; Scott et al., 2002). A espécie *E. coli* compreende diferentes linhagens filogenéticas, agrupadas em quatro categorias (A, B1, B2 e D), sendo reconhecido que as estirpes de virulência extra-intestinal pertencem, sobretudo, à linhagens B2 e a uma menor extensão à linhagem D (Clermont et al., 2000). Atualmente, existem métodos mais sensíveis e avançados de tipagem – o MLST (*Multi-locus Sequence Typing*). Este método analisa alelos de genes de manutenção celular, por comparação com uma base de dados disponível ao público (<http://mlst.ucc.ie/>) (Wirth et al., 2006).

Pela sua ecologia, associação a animais e dispersão ambiental, e pela plasticidade do seu genoma, a espécie *E. coli* é das mais estudadas e monitorizadas em termos de resistência a antibióticos. Ao longo dos anos tem vindo a tornar-se claro não só o aumento de prevalência de resistência, mas também a facilidade com que membros desta espécie adquirem e mobilizam novos genes de resistência (Kumarasamy et al., 2010; Nordmann & Poirel, 2005; Pitout et al., 2005).

A Resistência a Quinolonas

As quinolonas são uma família de antibióticos de largo espectro usados, quer na área clínica em infecções respiratórias e urinárias, quer na veterinária. Inicialmente, a sua aplicação restringia-se à área clínica, para tratamento de infecções urinárias, mas com as modificações químicas que foi sofrendo, a sua atividade foi sendo aumentada. Durante os anos 80, assistiu-se a um grande desenvolvimento de fluoroquinolonas que mostravam forte atividade contra bactérias Gram-negativo e, posteriormente, novas alterações na estrutura química fizeram com que estas moléculas se tornassem eficazes, também, contra bactérias Gram-positivo (Ruiz, 2003).

No final do século XX, chegou a ser considerado o agente antibacteriano mais consumido (Acar & Goldstein, 1997), sendo o seu consumo atual ainda bastante elevado, superado apenas pelos beta-lactâmicos. Em 2009, o uso de quinolonas na Europa foi considerado alto pela ESAC (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*) e em Portugal – o terceiro país com maior consumo de quinolonas – o consumo é de 3,04 DID (dose diária definida por 1000 habitantes por dia) (ESAC, 2009), sendo que 23,8% dos isolados clínicos de *E. coli*, em Portugal, são resistentes a quinolonas (ESAC, 2009). Valores mais elevados foram reportados em Espanha, com 32,8% de prevalência de resistência e em Itália com 39,2%.

O modo de funcionamento das quinolonas consiste em inibir a ação das enzimas topoisomerase IV e DNA girase. Estas enzimas, controlam o processo de desenrolamento do DNA e, ao inibir a sua ação, as quinolonas impedem que o DNA seja transcrito e replicado.

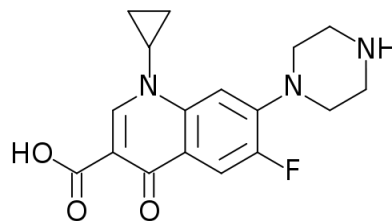


Figura 1.1 – Estrutura molecular da ciprofloxacina, uma fluoroquinolona. Retirado de Wikipedia.org.

A resistência às quinolonas passa pela alteração dos alvos de ação das quinolonas, ou pela diminuição da sua acumulação no citoplasma, quer por modificações na permeabilidade da membrana externa, quer por sobre-expressão de bombas de efluxo (Poirel et al. 2008; Ruiz, 2003). Os genes cromossómicos *gyrA* e *parC*, responsáveis pela formação da subunidade A da enzima DNA girase e topoisomerase IV, respetivamente, são exemplos de genes que sofrem mutações levando à alteração dos locais alvo das quinolonas e portanto determinando fenótipos de resistência (Moon et al., 2010). Estas mutações são herdadas e podem estar relacionadas com a filogenia do hospedeiro. Contudo, a resistência a esta família de antibióticos não é exclusivamente cromossómica, podendo ser transferida horizontalmente numa população por elementos genéticos móveis, com principal destaque para o papel dos plasmídeos.

Existem vários genes localizados em plasmídeos que podem tornar as bactérias resistente a quinolonas, ou aumentar significativamente a concentração mínima inibitória. Na literatura, estes genes têm vindo a ser designados de *Plasmid-mediated Quinolone Resistance* (PMQR). Em 2002, Tran & Jacoby descreveram um gene (*qnrA1*) que codifica uma proteína de 218 aminoácidos, que protege a DNA girase da ação das quinolonas. Desde então, foram descobertas várias variantes desse gene (*qnrA-D* e *qnrS*) (Wang et al., 2009; Cavaco et al., 2009; Cattoir et al., 2007; Bönemann et al., 2006). Um outro gene que confere resistência às quinolonas é o *aac(6')-Ib-cr*. O seu ancestral, o gene *aac(6')-Ib*, codifica uma acetiltransferase responsável pela resistência a antibióticos da família dos aminoglicosídeos. Contudo, a variante *cr* de *aac(6')-Ib* possui duas mutações responsáveis pela alteração dos aminoácidos arginina para triptofano (TGG > AGG) e tirosina para ácido aspártico (GAT > TAT), nas posições 102 e 179, respetivamente, que permitem que esta enzima acetile a ciprofloxacina e a norfloxacina, conduzindo ao aumento da concentração mínima inibitória do antibiótico (Robicsek et al., 2006).

A resistência às quinolonas também pode ocorrer através do transporte ativo das moléculas para fora do citoplasma (efluxo). O gene *qepA* é responsável pela produção de uma bomba de efluxo que torna a bactéria hospedeira resistente (Périchon et al., 2007; Yamane et al., 2007).

A Resistência a Beta-lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos impedem a síntese da parede celular das bactérias por se ligarem a umas proteínas (PBPs, *penicillin-binding* proteins) que integram a estrutura da parede celular (Richmond & Sykes, 1973) e, atualmente, são a classe de antibióticos mais utilizada na prática clínica (ESAC, 2009).

As beta-lactamases são a principal causa de resistência a esta classe de antibióticos em bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (French, 2010), tendo havido um aumento de incidência e prevalência de beta-lactamases de largo espectro (ESBLs) (Cantón et al., 2008). Não existe um consenso para uma definição precisa de ESBLs. Contudo é comum defini-las como enzimas capazes de conferir resistência a penicilinas, a cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, e aztreonam (mas não a cefamicinas, nem carbapenemo) por hidrólise destes antibióticos e que são inibidas por inibidores beta-lactâmicos, como o ácido clavulânico (Paterson & Bonomo, 2005). As ESBLs podem ser divididas em classes de A a D. Na classe A, encontram-se as beta-lactamases do tipo TEM, SHV e CTX-M, sendo TEM-1 a mais encontrada em bactérias Gram-negativo. Grande parte da resistência a estes antibióticos deve-se à produção de TEM-1, estando descritas mais de 170 variantes (Salverda et al., 2010). SHV-1, que partilha cerca de 68% de homologia de aminoácidos com TEM-1, é responsável pela resistência a ampicilina mediada por plasmídeos em *K. pneumoniae* (Paterson et al., 2003) e existem mais de 60 variantes desta enzima. As enzimas CTX-M representam outros exemplos de beta-lactamases adquiridas por transferências de plasmídeos e são conhecidas mais de 110 variantes (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp>). Este tipo de beta-lactamase pode ser encontrado, sobretudo, em estirpes de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* e de *E. coli*. Hoje

em dia, as CTX-M são as ESBLs mais prevalentes em hospitais (Cantón et al., 2008) e a variante CTX-M-15 a mais dispersa no mundo (Cantón et al., 2008).

As beta-lactamases AmpC (classe C) são importantes cefalosporinases. Os genes que codificam estas enzimas estão maioritariamente localizados no cromossoma bacteriano, embora possam ser também transportados em plasmídeos (Jacoby, 2009).

As beta-lactamases do tipo OXA (classe D) são mais frequentemente encontradas em *Pseudomonas aeruginosa* do que em *Enterobacteriaceae* (Paterson & Bonomo, 2005). O gene *bla*_{OXA-1} é frequentemente detetado em estirpes de *E. coli* resistentes a ampicilina, estando associado com outros genes codificantes de ESBLs, tais como *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-15} (Poirel et al., 2010).

Os Plasmídeos como Veículo de Transmissão de Genes

Os plasmídeos são moléculas de DNA, lineares ou circulares, com replicação autónoma (Carattoli, 2011; Novick, 1987). Eles contribuem para aumentar a diversidade genética pois permitem integrar e transferir genes entre diferentes bactérias, através de processos de conjugação (Francia et al., 2004). A plasticidade dos genomas bacterianos, sobretudo de realizar transferência horizontal de genes é um dos mais importantes factores para a adaptação das populações bacterianas. Estes processos podem ter enormes consequências na saúde pública uma vez que potenciam a dispersão de factores de virulência, como adesinas e citotoxinas, e de resistência a agentes com acção antimicrobiana (antibióticos, metais pesados) (Thomas & Nielsen, 2005).

O tamanho dos plasmídeos de bactérias ambientais pode variar desde menos de uma dezena até algumas centenas de kilobases. O mesmo acontece com o seu número de cópias na célula (desde 5 cópias até 700). O número de cópias é considerado uma característica individual de cada plasmídeo, que é controlado por um sistema regulador da replicação (replicão) inserido no próprio plasmídeo (Novick, 1987). No entanto, ao contrário do que acontece com o número de cópias, a estabilidade de um plasmídeo depende do funcionamento coordenado de uma série de elementos reguladores, codificados por esse plasmídeo, e da sincronia com determinadas funções do hospedeiro. A falha num destes pressupostos pode resultar na instabilidade, e consequente perda, do plasmídeo.

Os integrões representam um dos componentes importantes na disseminação de elementos genéticos de resistência a antibióticos. Estes elementos genéticos, que são sistemas de captura de genes, facilitando a disseminação, podem estar localizados em plasmídeos ou no cromossoma. Dois componentes presentes nos integrões são i) o gene *intI* que codifica uma integrase (proteína que promove a integração dos integrões a outros plasmídeos), juntamente com um local específico de recombinação *attI* e um promotor forte, e medeiam a integração de genes de resistência por um mecanismo de recombinação específica; e ii) as cassetes de genes que podem ser incorporadas. Por outras palavras, os integrões possuem duas regiões conservadas separadas por uma região variável, onde se podem integrar os genes, ou cassetes de genes. A informação para codificar a integrase e a região promotora localiza-se na região conservada a 5', enquanto que a região conservada 3' contém

genes de resistência (*qacEΔ1*; *sulI*) e uma *open reading frame* (*orf5*) de função desconhecida (Levesque et al., 1995).

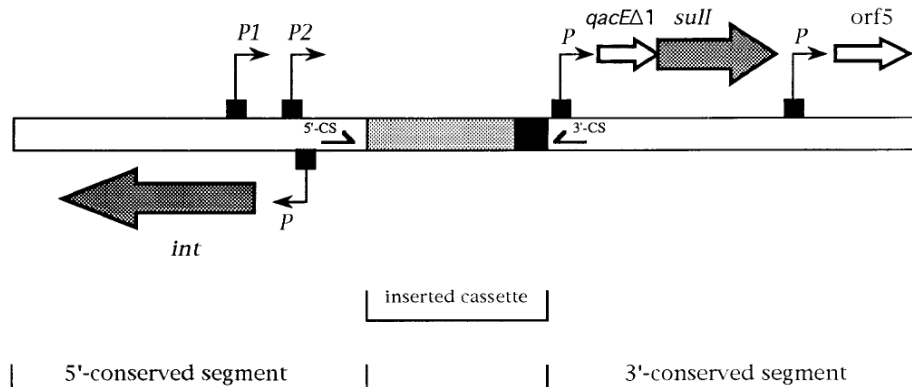


Figura 1.2 – Estrutura geral de um integrão. As setas indicam a direção da transcrição. Adaptado de Levesque et al. (1995).

Classificação dos Plasmídeos com base nos Grupos de Incompatibilidade

A incompatibilidade (Inc) dos plasmídeos é, normalmente, definida como a incapacidade de dois plasmídeos distintos com do mesmo grupo de incompatibilidade, residentes no mesmo hospedeiro, serem herdados e manterem-se na célula apesar da ausência de pressão seletiva externa (Novick et al., 1976). Ou seja, dois plasmídeos dizem-se incompatíveis se a presença de um interferir na replicação do outro, ao ponto de levar à sua perda. Portanto, plasmídeos que tenham a mesma origem de replicação são incompatíveis. A origem de replicação, também conhecida como replicão, consiste num conjunto de genes, reconhecidos na célula hospedeira, e que codificam proteínas específicas para a replicação do plasmídeo (Kollek et al., 1978). O grupo de incompatibilidade é portanto definido pela origem de replicação.

Existem pelo menos 27 grupos de incompatibilidade de plasmídeos caracterizados na família *Enterobacteriaceae*. Em 2005, foi criado um sistema de detecção baseado na técnica de PCR, *PCR-based Replicon Typing* (PBRT), que permite determinar os principais tipos de grupos de incompatibilidade (Carattoli et al., 2005). Esta pode ser uma metodologia interessante em estudos de epidemiologia de resistência, visto a transmissão de resistência entre diferentes estirpes e hospedeiros poder estar associada a determinados grupos de incompatibilidade de plasmídeos (Carattoli, 2009).

Os plasmídeos IncF são os que mais estão associados com genes de resistência a beta-lactâmicos, a quinolonas e a aminoglicosídeos (Carattoli, 2009). De facto, os plasmídeos IncF têm especial interesse pois, muito provavelmente, contribuem para a adaptação da bactéria hospedeira. Além de transportar genes que codificam informação importante para a manutenção e estabilidade do plasmídeo, só podem transportar genes de virulência e resistência a antibióticos (Villa et al., 2010). Mais concretamente, alguns determinantes como citotoxinas e fatores de adesão associados a

estirpes muito virulentas (como a estirpe hemorrágica, enteropatogénica ou enteroinvasiva) estão presentes em plasmídeos deste grupo de incompatibilidade (Carattoli, 2009).

Outra particularidade dos plasmídeos IncF reside no facto da sua transmissão ser limitada à família *Enterobacteriaceae*. Geralmente, existem nas bactérias em pequeno número de cópias, possuem um tamanho aproximado a 100 kb e podem transportar mais que um replicação. Este estatuto de “multi-replicação” (quando a bactéria transporta mais do que um replicação) permite alargar o espectro de alcance de possíveis hospedeiros (*broad host-range*) (Villa et al., 2010). A estrutura clássica dos plasmídeos incF envolve um replicação FII, regulado por CopA (uma sequência de RNA *antisense* de 90 nucleótidos) e pelos replicões FIA e FIB, que são reguladas pelas proteínas RepA e RepE (Villa et al., 2010). Em 2010, Villa et al. descreveram um método (*Replicon Sequence Typing – RST*) que permite comparar plasmídeos similares de bactérias de diferentes fontes com base nos replicões IncF. A capacidade de reconhecer e categorizar plasmídeos em grupos homogéneos, com base na sua semelhança filogenética, pode ser útil para analisar a sua distribuição na natureza, as relações com a célula hospedeira (Francia et al., 2004) e ser útil no suporte à vigilância para o aparecimento/dispersão de genes de resistência (Villa et al., 2010).

Tabela 1.1 – Famílias de plasmídeos associadas à presença de genes plasmídicos de resistência a quinolonas em *Enterobacteriaceae* (Carattoli, 2009).

Genes	Replicões
<i>qepA</i>	FII, FIA, FIB
<i>qnrA</i>	FII, L/M, N, HI2, I1
<i>qnrB</i>	FII, FIA, L/M, N
<i>qnrS</i>	FII, FIA, FIB, L/M, N, HI2, ColE, R, U, Q
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	FII, FIA, L/M, N, HI2, I1, ColE, R

Pelo facto de os genes de resistência a quinolonas conhecidos estarem associados, maioritariamente, aos plasmídeos IncF, não serão explorados, neste estudo, outros grupos de incompatibilidade. No entanto, não se pode deixar de referir que as famílias de plasmídeos IncL/M, IncN e IncHI2 também têm um papel importante na disseminação destes genes (Carattoli, 2009; García-Fernández & Carattoli, 2010; García-Fernández et al., 2011), embora possivelmente menos preponderante.

Objetivo do Estudo e Plano de Trabalho

Este estudo procurou contribuir para a compreensão da dispersão de resistência a quinolonas em isolados de *E. coli* provenientes de águas residuais municipais e hospitalares. Especificamente, procurou-se conhecer os tipos e características de plasmídeos presentes em bactérias resistentes a quinolonas, portadoras ou não de genes supostamente adquiridos por transferência horizontal de genes.

Para tal, foram estudados 11 estirpes de coliformes, colhidas de águas residuais da região do Porto e de Coimbra, resistentes a ciprofloxacina. Eram coliformes, presumíveis fermentadores da lactose (*lacZ* positivo) e continham, pelo menos, um gene adquirido de resistência a quinolonas.

Os tipos de DNA plasmídico, genes de resistência ou de integrões comumente presentes em plasmídeos foram caracterizados em extractos de DNA total e de DNA plasmídico. Os resultados foram analisados em função do local de isolamento, perfil de resistência e linhagem filogenética dos hospedeiros.

2. Materiais e Métodos

Isolados Bacterianos

Os isolados bacterianos estudados neste trabalho foram obtidos a partir de efluente hospitalar e de água residual bruta e tratada de três ETARs municipais. As estirpes em estudo foram seleccionadas de um conjunto de isolados coleccionados no periodo de 2008 a 2011. Estas bactérias foram isoladas em meio mFC (*Membrane Fecal Coliform Agar* – Difco) e crio-preservadas em meio LB (*Lysogeny Broth*) (composição por litro: 10 g triptona, 5 g extrato de levedura e 10 g NaCl com 15% (p/v) de glicerol) à temperatura de -80°C. Estes isolados foram identificados ao nível de espécie com base na análise da sequência do gene para o RNA ribossomal 16S (Lane, 1991) e presença do gene *lacZ* (Higgins et al., 2007).

Os 11 isolados incluídos no estudo estão indicados na Tabela 2.1

Tabela 2.1 – Características dos isolados em estudo.

Designação	Identificação	Isolamento	
		Tipo de água	Local
H1FC1	<i>E. fergusonii</i>	Efluente Hospitalar	Hospital
H1FC22	<i>E. fergusonii</i>	Efluente Hospitalar	Hospital
H1FC53	<i>E. coli</i>	Efluente Hospitalar	Hospital
A1FCC2	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 1
A2FCC14	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 2
SA4FC36A	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 3
SA4FC77	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 3
A5EL5	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 1
E2FCC15	<i>E. coli</i>	Saída ETAR	ETAR 2
E5EL20	<i>E. coli</i>	Saída ETAR	ETAR 1
M3EC1	<i>E. coli</i>	Saída ETAR	ETAR 2

Extração de DNA

Para extração do DNA total de cada isolado bacteriano procedeu-se à fervura das suspensões celulares. Para obtenção de DNA plasmídico usou-se um kit comercial com extração por método de lise alcalina.

Na extração por fervura (Wiedmann-al-Ahmad et al., 1994), cultivaram-se os isolados puros em meio PCA enriquecido com 4 mg/L de ciprofloxacina (Thermo Scientific, EUA), a 30°C, durante 24 horas.

Recolheu-se alguma biomassa e ressuspendeu-se em 100 µL de água ultrapura. A suspensão foi aquecida a 94°C, durante 10 min., e imediatamente colocada em gelo, durante os 5 min. seguintes. Centrifugou-se (13.000 g, 2,5 min.), pipetou-se o sobrenadante e armazenou-se o DNA extraído a -20 °C.

Na extração de DNA plasmídico, o kit usado foi GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EUA). De um modo geral, este kit adota o método de lise alcalina descrito por Birnboim & Doly (1979) seguido de uma etapa de purificação em colunas de sílica. Resumidamente, usa-se uma solução de ressuspensão com uma enzima degradadora de RNA (RNase A) e uma solução de lise fortemente alcalina com SDS (duodecil sulfato de sódio) e que lisa as células e desnatura as macromoléculas. Depois é adicionada uma solução neutralizante que permite que a renaturação do DNA plasmídico (mas não a do DNA cromossômico devido à diferença de tamanho entre ambos) e faz-se passar o DNA pelas colunas de sílica. Estas colunas fixam seletivamente o DNA, que possui forte afinidade a esta resina, e pós lavagens sucessivas, com uma solução de etanol, o DNA é eluído num tampão específico (Tris-HCl).

Caracterização Genotípica dos isolados

O grupo filogenético foi determinado pela amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e da região não codificante TSPE4.C2, segundo o método descrito por Clermont et al. (2000). Foram usados 3 pares de *primers*: ChuaA.1 (5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3') e ChuaA.2 (5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'); YjaA.1 (5'-TGAAGTGTGACGAGACGCTG-3') e YjaA.2 (5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'); TspE4C2.1 (5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3') e TspE4C2.2 (5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'); que resultam na formação de fragmentos de tamanho 279 bp, 211 bp e 152 bp, respetivamente. A reação ocorreu em volumes de 20 µl, sendo 6,35 µl de água ultra-pura, 4 µl de 1 mM dNTP, 2 µl de tampão de reação (10x com KCl), 1 µl de 25 mM de MgCl, 0,4 µl de cada *primer* (50 µM), 1,25 µl de Taq polimerase (2 U/ µl) e 3 µl de DNA. O programa no termociclador consistiu num passo inicial de desnaturação a 94°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 30 seg. a 94 °C, 30 seg. a 59 °C e 30 seg. a 72 °C e um período de elongação final de 5 min. a 72 °C. Os isolados foram classificados, de acordo com a combinação dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento TSPE4.C2, nas categorias: A (-/-/ ou -/+/-), B1 (-/-/+), B2 (+/+/- ou +/+ /+) e D (+/-/ ou +/- /+).

Para obter informação adicional sobre os genótipos dos isolados, utilizou-se o método de *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Os *primers* e as condições para a amplificação por PCR de sete genes constitutivos (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* e *recA*) foram as descritas por Wirth et al. (2006).

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) (90 V, 35 min.), corado em *Midori Green Advanced DNA Stain* (NIPPON Genetics Europe, Alemanha). Os

fragmentos amplificados foram purificados (GRS PCR & Gel Band Purification Kit – GRISP, Porto, Portugal) e sequenciados (MacroGen Europe, Holanda) com um sequenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems). Posteriormente, a qualidade das sequências foi confirmada manualmente usando o editor BioEdit (Hall, 1999).

A sequência de nucleótidos para cada um dos sete *loci* foi comparada com a base de dados MLST (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>), sendo atribuído uma identificação de sequência tipo (*sequence type*, ST).

Perfis de Resistência a Antibióticos

Os perfis de resistência a antibióticos foram determinados pelo método Kirby-Bauer, seguindo os critérios de interpretação recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). As suspensões bacterianas (densidade ótica de 0,2 a 610 nm) foram inoculadas em agar Mueller-Hinton (Oxoid. Composição por litro: 300 g infusão de carne desidratada, 17,5 g hidrolisado de caseína, 1,5 g amido e 17 g agar). Para a difusão dos antibióticos em agar usaram-se discos impregnados (Oxoid): amoxicilina (AML, 25 µg); ticarcilina (TIC, 75 µg); cefalotim (CEF, 30 µg); ceftazidima (CAZ, 30 µg); meropenemo (MEM, 10 µg); sulfametoxazol (SUL, 25 µg); sulfametoxazol + trimetoprim (SXT, 25 µg); gentamicina (GEN, 10 µg); estreptomicina (STR, 10 µg); ciprofloxacina (CIP, 5 µg); tetraciclina (TET, 30 µg) e colistina sulfato (CT, 50 µg). A leitura do halo de inibição dos discos foi efetuada após incubação a 37°C, durante 16 horas, sendo os resultados classificados em: suscetível (S), intermédio (I) ou resistente (R). Como controlos usaram-se as estirpes de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* DSM 1117.

Caracterização dos Grupos de Incompatibilidade dos Plasmídeos

A determinação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos foi realizada de acordo com o método descrito por Carattoli et al. (2005). Através de várias reações de PCR (5 multiplex e 3 simplex) são detetados os tipos de plasmídeos mais representativos da família *Enterobacteriaceae* (Couturier et al., 1988): FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F e FIIA.

Foram preparadas reações de 25 µL, contendo 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1x tampão de reação, 0,25 µmol de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 0,25 µL de DNA molde. O programa do termociclador, à exceção do que se utilizou para a reação simplex-F (cuja diferença é a temperatura de *annealing* de 52 °C), consistiu num passo inicial de 5 min. a 94 °C seguido de 30 ciclos de 1 min. a 94 °C, 30 seg. a 60 °C e 1 min. a 72 °C e um período de elongação final de 10 min. a 72 °C.

Tabela 2.2 – Primers usados para caracterização dos grupos de incompatibilidade (Carattoli et al., 2005).

Nome	Sequência DNA	Local alvo	Comprimento (bp)
HI1 FW	5'-GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC-3'	parA-parB	471
HI1 RV	5'-TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA-3'		
HI2 FW	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC-3'	iterons	644
HI2 RV	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'		
I1 FW	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	RNAI	139
I1 RV	5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'		
X FW	5'-AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT-3'	Ori γ	376
X RV	5'-TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC-3'		
L/M FW	5'-GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG-3'	repA,B,C	785
L/M RV	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'		
N FW	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	repA	559
N RV	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'		
FIA FW	5'-CCATGCTGGTCTAGAGAAGGTG-3'	iterons	462
FIA RV	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'		
FIB FW	5'-GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG-3'	repA	702
FIB RV	5'-CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'		
W FW	5'-CCTAAGAACAACAAGCCCCCG-3'	repA	242
W RV	5'-GGTGCGCGGCATAGAACCGT-3'		
Y FW	5'-AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	repA	765
Y RV	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT-3'		
P FW	5'-CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA-3'	iterons	534
P RV	5'-TCACGCGCCAGGGCGCAGCC-3'		
FIC FW	5'-GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG-3'	repA2	262
FIC RV	5'-TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT-3'		
A/C FW	5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3'	repA	465
A/C RV	5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'		
T FW	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	repA	750
T RV	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'		
FII_S FW	5'-CTGTCGTAAGCTGATGGC-3'	repA	270
FII_S RV	5'-CTCTGCCACAAACTTCAGC-3'		
F_{repB} FW	5'-TGATCGTTTAAGGAATTTTG-3'	RNAI/repA	270
F_{repB} RV	5'-GAAGATCAGTCACACCATCC-3'		
K/B FW	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	RNAI	160
K RV	5'-TCTTTCACGAGCCCGCCAAA-3'		
B/O RV	5'-TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA-3'	RNAI	159

Tratamento dos Extratos de DNA com Plasmid-Safe

O tratamento enzimático *Plasmid-Safe* (Epicentre, EUA) é recomendado como passo final de purificação de preparações de DNA plasmidico e cosmidico, evitando a contaminação com DNA genômico (indicações do fabricante). Este tratamento consiste na adição de uma DNase dependente de ATP, que hidrolisa seletivamente o DNA linear de cadeia dupla a 37° C.

Cada reação ocorreu em volumes de 50 µL, dos quais 42 µL eram de DNA, 5 µL de tampão de reação (330 mM Tris-acetato (pH 7,5), 660 mM acetato de potássio, 100 mM acetato de magnésio e 5,0 mM DTT), 2 µL de ATP e 1 µL de DNase. Durante 3 horas e 30 minutos, a 37° C, a enzima esteve a atuar sobre o DNA, sendo depois inativada termicamente (70° C, durante 30 min.).

Para verificar a eficácia deste tratamento enzimático, foram realizadas amplificações por PCR do rRNA 16S (gene cromossomal), cujo resultado deveria ser negativo, e dos replicões FIA/FIB (grupos de incompatibilidade), cujo resultado deveria ser positivo.

Pesquisa de Determinantes Genéticos Associados à Resistência a Antibióticos

Para a detecção de genes e/ou de mutações seguiu a metodologia descrita por Figueira et al. (2011b). Para identificar as mutações nas sequências dos genes *gyrA*, *parC* e *aac(6')-Ib-cr*, descritas como estando associadas a resistência a quinolonas (Goñi-Urriza et al., 2002; Robicsek et al., 2006), foram usadas as sequências de referência de estirpes susceptíveis a quinolonas disponíveis no GenBank (ADUQ01000080.1 para *gyrA*; NC_000913.2 para *parC*; FJ619242.1 para *aac(6')-Ib* e FJ594767.1 para *aac(6')-Ib-cr*). Os genes de resistência a β-lactâmicos *bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{SHV}* e das integrases de classe 1 e 2 foram pesquisados de acordo Henriques et al. (2006). A amplificação da região variável dos integrões de classe 1 foi realizada com os primers CS3-CS5, de acordo com Figueira et al. (2011a). Nos casos em que a região variável apresentou tamanho superior a 500 bp, fez-se a subsequente análise da sequência nucleotídica. Foram também pesquisados genes de resistência a mercúrio (genes *merA* e *merB*) segundo o protocolo descrito por Liebert et al. (1997).

Tabela 2.3 - Determinantes genéticos pesquisados, primers utilizados e referência do método utilizado.

Gene	Primer	Sequência DNA (5' – 3')	Tamanho (bp)	Referência
<i>qnrA</i>	qnrAm F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	580	Cattoir et al., 2007
	qnrAm R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC		
<i>qnrB</i>	qnrBm F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	264	
	qnrBm R	TTTGCGYYCGCCAGTCGAA		
<i>qnrS</i>	qnrSm F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	

	qnrSm R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG		
qnrC	qnrC-fw	GGGTTGTACATTTATTGAATC	447	Wang et al., 2009
	qnrC-rv	TCCACTTTACGAGGTTCT		
qnrD	qnrD-fw	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582	Cavaco et al., 2009
	qnrD-rv	AACAAGCTGAAGCGCCTG		
qepA	qepA Fw	TGGTCTACGCCATGGACCTCA	1137	Périchon et al., 2007
	qepA Rv	TGAATTCGGACACCGTCTCCG		
aac(6')-Ib	aac(6)-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	482	Park et al., 2006
	aac(6)-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
bla_{TEM}	bla _{TEM} FW	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1080	DiPersio et al., 2005
	bla _{TEM} RV	GACAGTTACCAATGCTTAATCA		
bla_{CTX}	bla _{CTX} FW	TTAATGATGACTCAGAGCATTC	901	
	bla _{CTX} RV	GATACCTCGCTCCATTTATTG		
bla_{SHV}	bla _{SHV} FW	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	626	
	bla _{SHV} RV	AGCAGGGCGACAATCCCGCG		
bla_{OXA}	OXA-A_F	ACACAATACATATCAACTTCGC	814	Henriques et al., 2006
	OXA-A_R	AGTGTGTTTAGAATGGTGATC		
	OXA-B_F	CTCAACCCATCCTACCCACC	561	
	OXA-B_R	CAAGCCAAAGGCACGATAGTTG		
	OXA-C_F	CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG	625	
	OXA-C_R	CATGATTTTGGTGGGAATGG		
merA	A1_F	ACCATCGGCGGCACCTGCGT	1238	Liebert et al., 1997
	A5_R	ACCATCGTCAGGTAGGGGAACAA		
merB	A6_F	GCCGACCAGTTGTTCCCCTACCTGACG	928	Liebert et al., 1997
	D1_R	CGCAGATATGCACGCTCACCC		
Int1-1	Int1-1_F	CCTCCCGCACGATGATC	280	Henriques et al., 2006
	Int1-1_R	TCCACGCATCGTCAGGC		
Int1-2	Int1-2_F	TTATTGCTGGGATTAGGC	233	
	Int1-2_2	ACGGCTACCCTCTGTTATC		
CS3-CS5	3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA	> 500	Levesque et al., 1995
	5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG		

Nota: O tamanho do fragmento da região CS3-CS5 só é considerado se for maior que 500 bp. Y=C ou T; M=A ou C.

Preparação de Células Competentes e Transformação com DNA Plasmidico

Para a transformação bacteriana usaram-se células competentes de *E. coli* Top10 e extractos de DNA plasmidico obtidos com o kit acima referido.

A preparação das células competentes foi feita com base no método do cloreto de cálcio (CaCl₂) (Cohen et al., 1972; Mandel & Higa, 1970). A adição do cloreto de cálcio a uma suspensão celular

promove a formação de estruturas micelares nos lípidos do involucro celular. Quando mais tarde as células são colocadas em contacto com o DNA plasmídico, há associação entre este e os lipopolissacarídeos. Um choque térmico (passagem dos 4°C para os 42°C num espaço de tempo reduzido) irá criar orifícios na membrana e facilitar a entrada dos plasmídeos (Micklos et al., 2003). Se este plasmídeo puder ser reconhecido na nova célula hospedeira, haverá indícios de ter ocorrido transformação.

Para tornar as células competentes, adicionou-se 1/50 de volume de uma pré-cultura (mantida a 37°C, *overnight*, com agitação) de *E. coli* Top10 (em meio LB) a uma nova cultura (também mantida a 37°C, com agitação), até atingir uma densidade ótica (600 nm) de 0,5-0,8. Depois realizaram-se duas lavagens sucessivas em CaCl₂, 0,1 M, por centrifugação (3.500 rpm, 5 min., 4°C). Todos os passos foram intercalados com períodos de tempo em que as células ficaram em gelo e, no final, foi efetuado um passo de, pelo menos, 1h30 em gelo. As células competentes foram guardadas em 15% (p/v) de glicerol a -80°C.

Para proceder à transformação, quando necessário, descongelaram-se e dividiram-se as células competentes em gelo e em alíquotas de 50 µL. A cada alíquota adicionou-se, pelo menos, 140 ng de DNA plasmídico, deixando incubar 20 min. em gelo. De seguida promoveu-se um choque térmico, de 42°C durante 72 segundos, recolocando as suspensões novamente em gelo. De seguida, foi adicionado 950 µL de meio de recuperação SOC (composição por 100 mL: 2 g triptona, 0,5 g extrato de levedura, 1 mL NaCl (1M), 0,25 mL KCl (1M), 200 mM solução Mg²⁺ e 200 mM solução glucose) e deixou-se crescer durante 2h30 (a 37°C, com agitação). Plaqueou-se 300 uL (em triplicado) em meio PCA enriquecido com amoxicilina (36 µg/mL). O uso de amoxicilina deve-se ao facto de todos os isolados em estudo possuírem o gene *ampC* e a grande maioria possuir *bla*_{TEM-1} ou *bla*_{OXA-1} (7 dos 11 isolados), presumivelmente no plasmídeo.

As colónias que cresceram nestes meios eram os transformantes e foram repicados para meio igual e incubaram 24 horas. O perfil de resistência a antibióticos foi determinado como se descreveu acima. O DNA das células transformadas foi extraído por fervura, com o objectivo de pesquisar os genes de resistência transportados nos plasmídeos envolvidos na transformação.

Replicon Sequence Typing

Para avaliar a diversidade dos plasmídeos de um mesmo grupo de incompatibilidade, recorreu-se à caracterização por *Multilocus Sequence Typing* (*plasmid MLST*, <http://pubmlst.org/plasmid/>), como descrito por Villa et al.(2010). O resultado das amplificações foi confirmado por electroforese e, quando positivo, foi realizada a sequenciação dos produtos de PCR (Macrogen Europe, Holanda). Todas as sequências foram alinhadas com o programa MEGA5 (Tamura et al., 2011) e comparadas com a base de dados *plasmid MLST* (<http://pubmlst.org/plasmid/>; Jolley & Maiden, 2010).

3. Resultados e Discussão

Identificação e Caracterização dos isolados

Todos os isolados selecionados para este estudo apresentavam todas as características comuns aos membros da família das *Enterobacteriaceae*. Cresciam em meio mFC, formando colónias azuis, apresentavam reacção de catalase-positivo e de oxidase-negativo. Para complementar a identificação feita com base na análise da sequência para o gene 16S rRNA 16S, pesquisou-se a presença do gene *lacZ*, que codifica a enzima beta-galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose, e que está presente em *Escherichia* spp. Confirmou-se que todos os isolados continham este gene. A análise da sequência do gene que codifica o rRNA 16S permitiu afiliar 9 dos 11 isolados à espécie *Escherichia coli*, e outros dois, H1FC1 e H1FC22, a *Escherichia fergusonii* (Tabela 3.1). A determinação dos grupos filogenéticos pelo método de Clermont et al. (2000) permitiu verificar que os isolados H1FC53, SSA4FC77, E2FCC15 e M3EC1 eram do grupo A, A1FCC2 e SA4FC36A eram B1 e H1FC1, H1FC22, A2FCC14, A5EL5 e E5EL20 eram B2 (Tabela 3.1).

O perfil de resistência a antibióticos mostrou que todos os isolados possuíam múltiplas resistência a mais do que três classes de antibióticos (*multidrug-resistant* – *MDR*). Uma bactéria diz-se multi-resistente quando deixa de ser suscetível a, pelo menos, um agente em 3 ou mais categorias antimicrobianas (Magiorakos et al., 2012). O facto de todos os isolados serem MDR sugere a existência de diversos mecanismos de resistência codificados no cromossoma e/ou elementos genéticos móveis. Contudo, não foi encontrada nenhuma resistência a carbapenemo nem a colistina.

Os isolados SA4FC36A, A5EL5 e E5EL20 demonstraram um perfil de resistência igual entre si. Os isolados SA4FC77 e M3EC1 demonstraram possuir resistência combinada a cefalosporinas de terceira geração, a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Esta resistência combinada tem sido encontrada em isolados hospitalares de países europeus e a sua prevalência tem tendido a aumentar (ECDPC, 2012).

Tabela 3.1 – Características dos isolados em estudo.

Isolados	Espécie	Recolha		Grupo Filogenético		Sequence Type	Complexo MLST	Grupos Inc.	Padrão de Resistência a Antibióticos									
		Tipo	Local	Perfil	Classificação				AML	GEN	CIP	SXT	TET	CEF	CAZ	TIC	SUL	STR
H1FC1	<i>E. fergusonii</i>	Efluente Hospitalar	Hospital	+/+	B2	--	--	FIA, FIB	R	I	R	R	R	S	S	R	R	R
H1FC22	<i>E. fergusonii</i>	Efluente Hospitalar	Hospital	+/+	B2	--	--	FIA, FIB	I	R	R	S	S	S	S	S	R	I
H1FC53	<i>E. coli</i>	Efluente Hospitalar	Hospital	-/+	A	ST744	Sem Complexo	I1, FIB, B/O	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R
A1FCC2	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 1	-/+	B1	Desconhecido	Sem Complexo	I1, FIB	R	S	R	S	S	I	S	R	R	R
A2FCC14	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 2	+/+	B2	ST131	Sem Complexo	N, FIA	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
SA4FC36A	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 3	-/+	B1	Desconhecido	Sem complexo	FIA, FIB, Y, A/C, K	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
SA4FC77	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 3	-/+	A	ST443	ST205 Cplx	FIA, FIB, Y, A/C, K	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R
A5EL5	<i>E. coli</i>	Entrada ETAR	ETAR 1	+/+	B2	ST131	Sem Complexo	FIA, FIB, B/O	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
E2FCC15	<i>E. coli</i>	Saída ETAR	ETAR 2	-/+	A	Desconhecido	Sem Complexo	FIB	R	S	R	R	R	I	S	R	R	R
E5EL20	<i>E. coli</i>	Saída ETAR	ETAR 1	+/+	B2	ST131	Sem Complexo	FIA, FIB, B/O	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
M3EC1	<i>E. coli</i>	Saída ETAR	ETAR 2	-/+	A	ST10	ST10 Cplx	N, FIA, FIB	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R

Nota: todos os isolados mostraram ser suscetíveis a MEM e CT – omitido na tabela.

Determinação dos Grupos de Incompatibilidade dos Plasmídeos

Em todos os isolados foram detetados plasmídeos do grupo IncF. Os replicões FIA e FIB estavam ambos presentes na maioria dos isolados, com exceção de H1FC53, A1FCC2 e E2FCC15, que apenas contêm FIB, e A2FCC14, que contém apenas FIA. As estirpes com maior diversidade de plasmídeos em termos de grupos de incompatibilidade foram as isoladas na ETAR 3 (S4FC36A e SA4FC77, grupos filogenéticos B1 e A, respetivamente), que para além de plasmídeos IncF, continham plasmídeos pertencentes aos grupos IncY, IncA/C e IncK. Estes grupos de incompatibilidade não foram encontrados em mais nenhum isolado. O segundo grupo de incompatibilidade mais encontrado foi IncB/O, presente nas estirpes H1FC53, A5EL5 e E5EL20 (grupos filogenéticos A e B2, respetivamente), isoladas do efluente hospitalar, da entrada e da saída da ETAR 1. Os restantes grupos de incompatibilidade encontrados foram IncI1 e IncN, presentes apenas em 2 dos isolados. As estirpes H1FC53 e A1FCC2 (grupo filogenético A e B1), isoladas do efluente hospitalar e entrada da ETAR 1, possuíam plasmídeos IncI1. As estirpes A2FCC14 e M3EC1 (grupos filogenéticos B2 e A, respetivamente), isoladas da entrada e da saída da ETAR 2, possuíam os plasmídeos IncN.

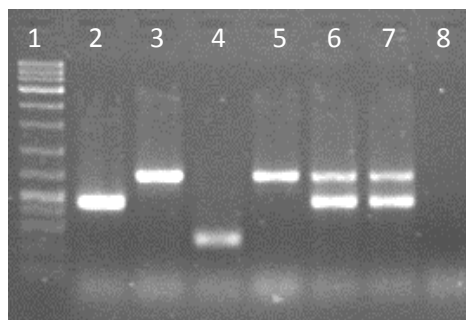


Figura 3.1 – Exemplo de um resultado obtido por PCR multiplex dos grupos de incompatibilidade. Poço 1 = marcador (100 bp); poço 2 = Controlo positivo FIA (462 bp); poço 3 = Controlo positivo FIB (702 bp); poço 4 = Controlo positivo W (242 bp); poço 5 = H1FC53; poço 6 = SA4FC36A; poço 7 = SA4FC77; poço 8 = Branco.

Pesquisa de Determinantes Genéticos de Resistência a Antimicrobianos

Como referido anteriormente, foi feita a deteção de mutações nos genes *parC* e *gyrA*. Foi observada uma mutação do gene *parC* em 9 dos 11 isolados (apenas A2FCC14 e E5EL20 não possuíam mutação). Esta mutação estava localizada na posição 80, onde a alteração do codão AGC para ATC resulta na alteração do aminoácido serina para isoleucina. Foram observadas duas mutações do gene *gyrA* em todos os isolados. Na posição 83, verificou-se a alteração do codão TCG para TTG, resultando na alteração do aminoácido serina para leucina. Na posição 87, verificou-se a mudança do codão GAC para AAC, que resulta na alteração do aminoácido aspartato para asparagina.

No que diz respeito aos genes plasmídicos de resistência a quinolonas testados (*qepA*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr*), apenas *qepA*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* foram encontrados. O gene *qepA* foi encontrado nos dois isolados provenientes da ETAR 3 (SA4FC36A e SA4FC77). O gene *qnrS* foi encontrado apenas no isolado A1FCC2 (ETAR 1). O gene *aac(6')-Ib-cr*, caracterizado pelas mutações nas posições 102 (no códon para arginina) e 179 (no códon para tirosina), foi detetado nos isolados H1FC22, H1FC53 (ambos do efluente hospitalar), A1FCC2 (ETAR 1) e A2FCC14 (ETAR 2).

Os resultados desta pesquisa estão indicados na Tabela 3.2.

Em relação aos genes que conferem resistência a beta-lactâmicos, o gene *ampC* foi detetado em todos os isolados; *bla_{TEM-1}* nos isolados H1FC53, A1FCC2, A2FCC14, SA4FC77, E2FCC15 e M3EC1; e *bla_{OXA-1}* nos isolados H1FC22, A1FCC2 e A2FCC14. Uma vez que todos os isolados são resistentes a beta-lactâmicos e que estes genes de resistência são muito comuns em enterobactérias, a detecção destes genes era esperada (Cantón et al., 2008; Pitout et al., 2005; Salverda et al., 2010). Contudo, seria de esperar a detecção de *bla_{CTX}*, uma vez que estas ESBLs do tipo CTX-M são das mais encontradas a nível mundial (Cantón et al., 2008; Pitout et al., 2005), tendo elevada prevalência em Portugal (Cantón & Coque, 2006). As estirpes produtoras de CTX-M são, normalmente, também resistentes a fluoroquinolonas (Machado et al., 2006; Morosini et al., 2006).

O gene *merA*, responsável pela resistência a mercúrio, foi detectado apenas nos isolados H1FC53 e E2FCC15.

Pesquisa e Caracterização de Integrões

Foi feita a pesquisa dos genes que codificam integrases de classe 1 e de classe 2, tendo apenas sido detetado o gene *Int1-1*, que codifica uma integrase de classe 1. Em todos os isolados em que se detetou integrase foi possível também ter amplificação da região CS5-CS3. Estes eram um total de dez. A análise do conteúdo dos integrões mostrou que seis dos integrões transportavam a cassette de genes *dfrA17-aadA5* (isolados H1FC1, H1FC22, H1FC53, A5EL5, E2FCC15 e E5EL20) e que, nos isolados SA4FC36A e SA4FC77, era transportada a cassette de genes *dfrA12-aadA2*. No isolado A1FCC2, o tamanho do amplicão CS5-CS3 era inferior a 500 bp, pelo que se considerou que a região variável estaria vazia. O integrão do isolado A2FCC14 apenas transportava o gene *dfrA25*. No isolado M3EC1, foi amplificada uma banda de, aproximadamente 800 bp, mas não se conseguiu obter uma sequência nucleotídica pura, mesmo após várias tentativas.

Tabela 3.2 – Determinantes genéticos pesquisados.

Isolados	Mutação <i>parC</i>	Mutações <i>gyrA</i>	Genes PMQR			Resistência B-lactâmicos			<i>merA</i>	Integrase (Classe 1)	Região variável do integrão de classe 1	
			<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{OXA-A}</i>	<i>ampC</i>			Tamanho (bp)	Genes
H1FC1	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1500	<i>dfrA17, aadA5</i>
H1FC22	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	1500	<i>dfrA17, aadA5</i>
H1FC53	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	1500	<i>dfrA17, aadA5</i>
A1FCC2	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	<500	-
A2FCC14	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	700	<i>dfrA25</i>
SA4FC36A	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	1600	<i>dfrA12, aadA2</i>
SA4FC77	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	1600	<i>dfrA12, aadA2</i>
A5EL5	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1500	<i>dfrA17, aadA5</i>
E2FCC15	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	1500	<i>dfrA17, aadA5</i>
E5EL20	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1500	<i>dfrA17, aadA5</i>
M3EC1	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	800	-

Foram omitidos da tabela todos os genes em que não houve nenhuma detecção (*qnrA-D*, *bla_{OXA-B/C}*, *bla_{CTX}*, *bla_{SHV}*, *merB* e Integrase de Classe 2). Encontram-se assinalados com “+” os genes que foram detetados e com “-” os que não foram detetados.

Isolamento e Purificação de Plasmídeos

Na tentativa de obter preparações de plasmídeos livres de DNA cromossômico usou-se o sistema enzimático *Plasmid-Safe*. Para o tratamento com *Plasmid-Safe*, foi usado o DNA extraído por fervura e com o kit de extração de DNA plasmídico. Verificou-se que o DNA extraído com o kit era totalmente degradado, não se tendo detectado amplificação do rRNA 16S, nem das replicões, após o tratamento. Foram testados vários tempos de reação, até um mínimo de 30 min. (como indicado pelo fabricante), mas o resultado foi igual para cada tempo testado.

Com o DNA extraído por fervura, obtiveram-se resultados diferentes. Foram realizadas várias tentativas, mas ao fim das 3 horas e 30 min., foi detectado rRNA 16S em praticamente todos os casos, o que significa que o tratamento enzimático não foi eficaz. Noutros casos, não foi detectado rRNA 16S, nem as replicões. O terceiro resultado obtido implicava a ausência de rRNA 16S e a presença das replicões. Este resultado não foi conseguido em todos os isolados.

Com este tratamento esperava-se obter melhores resultados, uma vez que este método já foi usado em diversos estudos para purificação de DNA plasmídico (Jeon et al., 2005; Jones & Marchesi, 2007; Suzuki et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Em virtude das dificuldades registradas, usou-se o método de transformação. Após múltiplas tentativas, apenas foi possível transformar as bactérias competentes de *E. coli* Top10 com os plasmídeos provenientes dos isolados H1FC53 e A1FCC2 usando DNA extraído com o kit.

O antibiograma (Tabela 3.3) destes transformados mostrou que ambos eram resistentes a AML, CEF, TIC e SUL, sendo ainda o transformado com os plasmídeos de H1FC53 resistente também a CAZ.

A detecção por PCR dos grupos de incompatibilidade e dos genes de resistência mostrou que apenas os plasmídeos com a replicação FIB é que foram inseridos na bactéria receptora. Como se pode ver na Tabela 3.3, houve alguns genes que inicialmente foram detectados no isolado original, mas que não foram detectados após a transformação, como por exemplo o gene *aac(6')-Ib-cr*, que foi detectado no transformado de H1FC53 e não no transformado de A1FCC2. O contrário ocorreu com *bla_{TEM-1}* que só foi detectado no transformado de A1FCC2, sendo esperado que fosse detectado nos dois transformados. Contudo, é de realçar a detecção de *aac(6')-Ib-cr*, após a transformação de H1FC53, de *qnrS* e de *bla_{TEM-1}*, após transformação de A1FCC2, e de *ampC*, após a transformação dos plasmídeos de ambos. Estes resultados demonstraram que estes plasmídeos estão diretamente relacionados com a transmissão e disseminação de resistências a quinolonas.

Tabela 3.3 – Tabela resumo do resultado do antibiograma e dos genes detetados nas bactérias *E. coli* Top10 transformadas.

Estirpe	Padrão de Resistência a Antibióticos										Genes PMQR		Resistência β -lactâmicos			<i>merA</i>	Integrase (Classe 1)
	AML	GEN	CIP	SXT	TET	CEF	CAZ	TIC	SUL	STR	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrS</i>	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>ampC</i>		
H1FC53	R	S	R	R	S	R	I	R	R	R	+	-	+	-	+	+	+
Transformado com H1FC53	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	+	-	-	-	+	-	-
A1FCC2	R	S	R	S	S	I	S	R	R	R	+	+	+	+	+	-	+
Transformado com A1FCC2	R	S	S	S	R	I	S	R	R	R	-	+	+	-	+	-	-
Top10	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	-	-	-	-	-	-	-

Estão representados os genes existentes nos isolados, estando assinalados com “+” os que foram detetados e com “-” os que não foram detetados. A sombreado encontram-se os genes que foram detetados antes e depois da transformação.

Replicon Sequence Typing

Uma vez que todos os isolados possuíam plasmídeos que pertenciam ao grupo de incompatibilidade IncF, foi realizada a análise *Replicon Sequence Typing* com base nos replicões deste grupo. No total, foram obtidas cinco alelos do replicão FII, 3 alelos do replicão FIA e 3 alelos do replicão FIB. Uma vez que alguns plasmídeos podem ter mais do que um tipo de replicação (“multi-replicação”), cada plasmídeo pode ser classificado segundo o tipo e número do alelo de cada replicação (Villa et al., 2010). Por exemplo, a designação F1:A1:B1 (atribuída aos plasmídeos dos isolados SA4FC77 e M3EC1) indica o alelo F1 do replicão FII, o alelo A1 do replicão FIA e o alelo B1 do replicão FIB. Desta forma, detectaram-se sete tipos de plasmídeos: F1:A2:B20 (em H1FC1, A5EL5 e E5EL20), F31:A4:B1 (em H1FC22), F24:A-B1 (em H1FC53 e A1FCC2), F40:A1:B- (em A2FCC14), F-A1:B26 (em SA4FC36A), F1:A1:B1 (em SA4FC77 e M3EC1) e F18:A-B1 (em E2FCC15). Estes resultados (Tabela 3.4) foram comparados com os perfis FAB atribuídos por Villa et al. (2010) aos plasmídeos depositados no GenBank.

Os perfis F1:A2:B20, F31:A4:B1, F40:A1:B- e F-A1:B26 não tiveram correspondência com nenhum dos perfis encontrados no GenBank. Estas combinações de replicões, por ainda não terem sido descritas, podem representar novos perfis, cujo estudo poderá ser relevante para a compreensão da disseminação de genes de resistência a antibióticos.

Os isolados cujos plasmídeos pertencem ao perfil F1:A2:B20 (H1FC1, A5EL5 e E5EL5), partilham a presença do gene *ampC* e de integrões de classe 1 com a cassete *dfrA17-aadA5*.

Os plasmídeos dos isolados SA4FC77 e M3EC1 correspondem ao perfil F1:A1:B1. Na verdade, este perfil foi atribuído ao plasmídeo pRSB107 (AJ851089) (o primeiro plasmídeo “multi-replicação” a ser totalmente sequenciado), também isolado de uma ETAR, e que confere resistência a vários antibióticos, possui mecanismos de aquisição de metais e outros mecanismos associados à virulência (Szczebanowski et al., 2005). Em ambos os isolados, foi detetado o gene *blaTEM-1*. De acordo com Szczebanowski et al. (2005), este plasmídeo é composto por várias sequências de inserção, o que indica que foi sofrendo sucessivos eventos de recombinação genética por transferência horizontal, podendo isto explicar a presença dos genes *ampC* (presente em SA4FC77 e M3EC1) e *qepA*, *dfrA12* e *aadA2* (presente apenas em SA4FC77).

E2FCC15 possui um plasmídeo cujo perfil FAB é igual ao encontrado por Tivendale et al. (2009) num isolado de *E. coli* APEC (avian pathogenic *E. coli*). O plasmídeo pVM01 (EU330199) possui uma região conservada com fatores de virulência (como adesinas) e sistemas de aquisição de metais.

Tabela 3.4 – Resultados obtidos RST do grupo *IncF* (fórmula FAB). Estão representados, o local de isolamento, as características de cada isolado (individuais e comuns entre isolados de cada perfil FAB), a estirpe de origem do plasmídeo com o mesmo perfil FAB publicada no GenBank e a sua referência. Adaptado de Villa et al. (2010).

Isolados	Local	Alelos			Fórmula FAB	Caraterísticas dos isolados		Estirpes com a mesma fórmula FAB (GenBank)	
		FII	FIA	FIB		Individuais	Comuns	Origem	Nº Acesso
H1FC1	Hospital								
A5EL5	ETAR 1	F1	A2	B20	F1:A2:B20	--	<i>ampC, dfrA17-aadA5</i>	--	--
E5EL20	ETAR 1								
SA4FC36A	ETAR 3	Ausente	A1	B26	F -:A1:B26	<i>qepA, ampC, dfrA12-aadA2</i>	--	--	--
H1FC22	Hospital	F31	A4	B1	F31:A4:B1	<i>aac(6')-Ib-cr, blaOXA-1, ampC, dfrA17-aadA5</i>	--	--	--
A2FCC14	ETAR 2	F40	A1	Ausente	F40:A1:B-	<i>aac(6')-Ib-cr, blaTEM-1, blaOXA-1, ampC, dfrA25</i>	--	--	--
H1FC53	Hospital					<i>merA, dfrA17-aadA5</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, blaTEM-1, ampC</i>	<i>E. coli, E. coli ExPEC, S. enterica Kentucky</i>	AF550679 CP000971, CU928146, CP001122
A1FCC2	ETAR 1	F24	Ausente	B1	F24:A -:B1	<i>qnrS, blaOXA-1</i>			
E2FCC15	ETAR 2	F18	Ausente	B1	F18:A -:B1	<i>blaTEM, ampC, merA</i>	--	<i>E. coli APEC</i>	EU330199
SA4FC77	ETAR 3					<i>qepA, dfrA12-aadA2</i>	<i>blaTEM-1, ampC</i>	<i>uncultured bacterium</i>	AJ851089
M3EC1	ETAR 2	F1	A1	B1	F1:A1:B1	--			

Os isolados H1FC53 e A1FCC2 possuem ambos um plasmídeo de perfil FAB F24:A-B1. Este tipo de plasmídeo possui relevância clínica uma vez que já foi associado a surtos de doenças neonatais na Polónia (Zienkiewicz *et al.*, 2007) e em França (Peigne *et al.*, 2009). De facto, tem sido sublinhada a polivalência de plasmídeos deste tipo quanto ao transporte de resistências a antibióticos (sobretudo beta-lactâmicos, ciprofloxacina, tetraciclina, streptomina e sulfamidas/trimetoprim). É de realçar que plasmídeos aparentados com estes, como são os encontrados em H1FC53 e A1FCC2, possam ser um fator importante de disseminação de resistências a antibióticos uma vez que circulam no ambiente em águas residuais.

4. Conclusões Gerais

Este estudo demonstrou que alguns plasmídeos, nomeadamente os pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncF, em *E. coli* isoladas de águas residuais são capazes de transmitir, genes resistência a antibióticos como *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS*, *bla_{TEM-1}* e *ampC*.

É demonstrado, ainda, que plasmídeos aparentados possam ser isolados de locais com características tão diferentes como o efluente hospitalar e o afluente de ETAR municipal, confirmando a capacidade de aquisição e disseminação de determinantes genéticos que estes plasmídeos possuem. O facto de possuírem uma origem de replicação semelhante e conservada, sugere uma origem comum, apesar do seu conteúdo genético variar.

Uma vez que os plasmídeos, no geral, têm um grande impacto na evolução do genoma, torna-se essencial uma melhor compreensão do seu papel na transferência e disseminação de resistências a antibióticos. Plasmídeos incF relacionados com a transmissão de resistência a quinolonas contribuem para a disseminação de genes em estirpes patogénicas de *E. coli*, pelo que o seu estudo mais aprofundado se torna fulcral.

5. Trabalho Futuro

Neste estudo foram estudados os plasmídeos de 11 isolados provenientes de diferentes ETARs, com especial enfoque nos que transportavam replicões *incF*. Seria interessante alargar o número de plasmídeos *incF* estudados para se poder ter uma melhor ideia se haverá alguma relação entre os plasmídeos e o local de onde foram isolados, e para se ter melhor percepção do tipo de pressão seletiva a que os plasmídeos estão sujeitos e como isso se reflete nos genes que transportam. Isso poderá trazer mais e melhor conhecimento sobre a dispersão da resistência a antibióticos e talvez novas abordagens para a eliminação das resistências no ambiente, assim como potenciais novos alvos de químicos de ação antibiótica.

Seria igualmente interessante explorar mais detalhadamente plasmídeos cujo perfil FAB não possui correspondência com os atualmente publicados, assim como explorar outras famílias de grupos de incompatibilidade de plasmídeos circulantes em águas residuais, como os *IncA/C* ou *incN*, para os quais existem protocolos de comparação *Multilocus sequence typing*.

Por fim, correlacionar linhagens bacterianas e a sua origem com a evolução dos plasmídeos permitiria saber se alguns tipos são mais comuns em determinadas linhagens, assim como a sua prevalência em determinados habitats. Esta abordagem seria ainda interessante para ajudar a compreender quais as vias de dispersão dos plasmídeos e das bactérias suas hospedeiras.

6. Bibliografia

- Acar, J. F., & Goldstein, F. W. (1997). Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24 Suppl 1, S67–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994781>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC342324/>
- Bönemann, G., Stiens, M., Pühler, A., & Schlüter, A. (2006). Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, qnrS2, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 3075–80. doi:10.1128/AAC.00378-06
- Cantas, L., Shah, S. Q. a, Cavaco, L. M., Manaia, C. M., Walsh, F., Popowska, M., ... Sørum, H. (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in microbiology*, 4(May), 96. doi:10.3389/fmicb.2013.00096
- Cantón, R, Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., & Coque, T. M. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 144–53. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x
- Cantón, Rafael, & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current opinion in microbiology*, 9(5), 466–75. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(6), 2227–38. doi:10.1128/AAC.01707-08
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8), 654–8. doi:10.1016/j.ijmm.2011.09.003
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219–28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.-J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394–7. doi:10.1093/jac/dkm204
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2), 603–8. doi:10.1128/AAC.00997-08
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2110–2114. doi:10.1073/pnas.69.8.2110

- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*, 52(3), 375–95. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=373151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- DiPersio, J. R., Deshpande, L. M., Biedenbach, D. J., Toleman, M. A., Walsh, T. R., & Jones, R. N. (2005). Evolution and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and molecular report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2003). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51(1), 1–7. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.08.001
- ESAC – European Surveillance of Antimicrobial Consumption ESAC Yearbook 2009. (2009).
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011*. Stockholm. doi:10.2900/6551
- Figueira, V., Serra, E., & Manaia, C. M. (2011). Differential patterns of antimicrobial resistance in population subsets of *Escherichia coli* isolated from waste- and surface waters. *The Science of the total environment*, 409(6), 1017–23. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.12.011
- Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., & Manaia, C. M. (2011). Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water research*, 45(17), 5599–611. doi:10.1016/j.watres.2011.08.021
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., & de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS microbiology reviews*, 28(1), 79–100. doi:10.1016/j.femsre.2003.09.001
- French, G. L. (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. *International journal of antimicrobial agents*, 36 Suppl 3, S3–7. doi:10.1016/S0924-8579(10)70003-0
- García-Fernández, A., & Carattoli, A. (2010). Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(6), 1155–61. doi:10.1093/jac/dkq101
- García-Fernández, A., Villa, L., Moodley, A., Hasman, H., Miriagou, V., Guardabassi, L., & Carattoli, A. (2011). Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 1987–91. doi:10.1093/jac/dkr225
- Goñi-Urriza, M., Arpin, C., Capdepu, M., Dubois, V., Caumette, P., & Quentin, C. (2002). Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(2), 350–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127024&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95 – 98. Retrieved from <http://www.citeulike.org/user/gonzalez/article/691774>
- Henriques, I. S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2006). Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Research in Microbiology*, 157(10), 938–47. doi:10.1016/j.resmic.2006.09.003
- Higgins, J., Hohn, C., Hornor, S., Frana, M., Denver, M., & Joerger, R. (2007). Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 227–35. doi:10.1016/j.mimet.2007.04.009

- Jacoby, G. a. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–82, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00036-08
- Jeon, B.-C., Jeong, S. H., Bae, I. K., Kwon, S. B., Lee, K., Young, D., ... Lee, S. H. (2005). Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea. *Journal of clinical microbiology*, 43(5), 2241–5. doi:10.1128/JCM.43.5.2241-2245.2005
- Jolley, K. A., & Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC bioinformatics*, 11(1), 595. doi:10.1186/1471-2105-11-595
- Jones, B. V., & Marchesi, J. R. (2007). Transposon-aided capture (TRACA) of plasmids resident in the human gut mobile metagenome. *Nature methods*, 4(1), 55–61. doi:10.1038/nmeth964
- 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. *MGG Molecular & General Genetics*, 162(1), 51–57. doi:10.1007/BF00333850
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., ... Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 10(9), 597–602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp. 115–175). Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10018533690/en/>
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 185–191. doi:10.1128/AAC.39.1.185
- Liebert, C. A., Wireman, J., Smith, T., & Summers, A. O. (1997). Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 1066–1076.
- Machado, E., Coque, T. M., Cantón, R., Baquero, F., Sousa, J. C., & Peixe, L. (2006). Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the aac(6')-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 3220–1. doi:10.1128/AAC.00473-06
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Manaia, C. M., Vaz-Moreira, I., & Nunes, O. C. (2012). *Antibiotic resistance in waste water and surface water and human health implications*. Springer-Verlag. Retrieved from <http://repositorio.ucp.pt/handle/10400.14/9950>
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), 159–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4922220>
- Michael, I., Rizzo, L., Mc Ardell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., ... Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water research*, 47(3), 957–95. doi:10.1016/j.watres.2012.11.027

- Micklos, D. A., Freyer, G. A., & Crotty, D. (2003). Basic Tools and Techniques of DNA Science. In *DNA Science: A First Course* (Second Edi.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Moon, D. C., Seol, S. Y., Gurung, M., Jin, J. S., Choi, C. H., Kim, J., ... Lee, J. C. (2010). Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolates. *International journal of antimicrobial agents*, *35*(1), 76–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.08.003
- Morosini, M.-I., García-Castillo, M., Coque, T. M., Valverde, A., Novais, A., Loza, E., ... Cantón, R. (2006). Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(8), 2695–9. doi:10.1128/AAC.00155-06
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *56*(3), 463–9. doi:10.1093/jac/dki245
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews*, *51*(4), 381–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1693440>
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtiss, R., Datta, N., & Falkow, S. (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriological reviews*, *40*(1), 168–89. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413948&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Park, C. H., Robicsek, A., Jacoby, G. a, Sahm, D., & Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *50*(11), 3953–5. doi:10.1128/AAC.00915-06
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*, *18*(4), 657–86. doi:10.1128/CMR.18.4.657-686.2005
- Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., & Bonomo, R. A. (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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *47*(11), 3554–60. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=253771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Peigne, C., Bidet, P., Mahjoub-Messai, F., Plainvert, C., Barbe, V., Médigue, C., ... Bonacorsi, S. (2009). The plasmid of *Escherichia coli* strain S88 (O45:K1:H7) that causes neonatal meningitis is closely related to avian pathogenic *E. coli* plasmids and is associated with high-level bacteremia in a neonatal rat meningitis model. *Infection and immunity*, *77*(6), 2272–84. doi:10.1128/IAI.01333-08
- Périchon, B., Courvalin, P., & Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(7), 2464–9. doi:10.1128/AAC.00143-07
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., Laupland, K. B., & Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *56*(1), 52–9. doi:10.1093/jac/dki166
- Poirel, L., Cattoir, V., & Nordmann, P. (2008). Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(4), 295–7. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01930.x

- Poirel, Laurent, Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(1), 24–38. doi:10.1128/AAC.01512-08
- Richmond, M. H., & Sykes, R. B. (1973). The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Advances in microbial physiology*, *9*, 31–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4581138>
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., ... Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *The Science of the total environment*, *447*, 345–60. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., ... Hooper, D. C. (2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature medicine*, *12*(1), 83–8. doi:10.1038/nm1347
- Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *51*(5), 1109–17. doi:10.1093/jac/dkg222
- Salverda, M. L. M., De Visser, J. A. G. M., & Barlow, M. (2010). Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS microbiology reviews*, *34*(6), 1015–36. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R., & Lukasik, J. (2002). Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(12), 5796–5803. doi:10.1128/AEM.68.12.5796-5803.2002
- Suzuki, M. T., Preston, C. M., Bèjà, O., de la Torre, J. R., Steward, G. F., & DeLong, E. F. (2004). Phylogenetic screening of ribosomal RNA gene-containing clones in Bacterial Artificial Chromosome (BAC) libraries from different depths in Monterey Bay. *Microbial ecology*, *48*(4), 473–88. doi:10.1007/s00248-004-0213-5
- Szczepanowski, R., Braun, S., Riedel, V., Schneiker, S., Krahn, I., Pühler, a, & Schlüter, a. (2005). The 120 592 bp IncF plasmid pRSB107 isolated from a sewage-treatment plant encodes nine different antibiotic-resistance determinants, two iron-acquisition systems and other putative virulence-associated functions. *Microbiology (Reading, England)*, *151*(Pt 4), 1095–111. doi:10.1099/mic.0.27773-0
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, *28*(10), 2731–9. doi:10.1093/molbev/msr121
- Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, *3*(9), 711–21. doi:10.1038/nrmicro1234
- Tivendale, K. a, Noormohammadi, A. H., Allen, J. L., & Browning, G. F. (2009). The conserved portion of the putative virulence region contributes to virulence of avian pathogenic Escherichia coli. *Microbiology (Reading, England)*, *155*(Pt 2), 450–60. doi:10.1099/mic.0.023143-0
- Tran, J. H., & Jacoby, G. a. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(8), 5638–42. doi:10.1073/pnas.082092899

- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *65*(12), 2518–29. doi:10.1093/jac/dkq347
- Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., ... Wang, M. (2009). New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(5), 1892–7. doi:10.1128/AAC.01400-08
- Wiedmann-al-Ahmad, M., Tichy, H., & Schön, G. (1994). Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR fingerprinting. *Applied and environmental microbiology*, *60*(11), 4066–71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., ... Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular microbiology*, *60*(5), 1136–51. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- Yamane, K., Wachino, J.-I., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., ... Arakawa, Y. (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(9), 3354–60. doi:10.1128/AAC.00339-07
- Zhang, T., Zhang, X.-X., & Ye, L. (2011). Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. *PloS one*, *6*(10), e26041. doi:10.1371/journal.pone.0026041
- Zienkiewicz, M., Kern-Zdanowicz, I., Gołębiewski, M., Zylińska, J., Mieczkowski, P., Gniadkowski, M., ... Ceglowski, P. (2007). Mosaic structure of p1658/97, a 125-kilobase plasmid harboring an active amplicon with the extended-spectrum beta-lactamase gene blaSHV-5. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *51*(4), 1164–71. doi:10.1128/AAC.00772-06