



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ESTIRPES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES: ACINETOBACTER BAUMANNII,
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Trabalho submetido por
Débora Alexandra Carqueija Marceliano da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ESTIRPES BACTERIANAS
MULTIRRESISTENTES: ACINETOBACTER BAUMANNII,
PSEUDOMONAS AERUGINOSA E STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

Trabalho submetido por
Débora Alexandra Carqueija Marceliano da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva

e coorientado por
Doutora Clara Leandro

novembro de 2016

Aos meus Pais.

“Sempre chegamos ao sítio aonde nos esperam.”

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família, por me ajudarem a realizar mais um sonho. À minha mãe e ao meu pai, que são os melhores do mundo. Ao meu avô Heitor, que será sempre o meu grande amor. À minha avó Lourdes por toda a ajuda e compreensão.

À Prof.^a Doutora Patrícia Cavaco Silva e à Doutora Clara Leandro, por toda a disponibilidade, ajuda, paciência e confiança que tiveram em mim.

Às minhas melhores amigas Mafalda, Catarina e Célia que me acompanharam neste longo percurso, que partilharam comigo momentos de muita alegria e também momentos de alguma tristeza, que me ouviram e que sempre me apoiaram. Sem elas este percurso não teria sido o mesmo.

Ao José Miguel, por toda a amizade e por todos os momentos passados.

Por fim, aos meus amigos mais antigos e aos que tive oportunidade de conhecer durante estes cinco anos, e que de alguma forma me acompanharam durante a realização deste percurso académico.

RESUMO

Objetivo: Tendo em conta a atual emergência de clones de estirpes bacterianas multirresistentes, realizou-se uma investigação de forma a conhecer a prevalência de estirpes bacterianas multirresistentes e a sua disseminação na Europa nos últimos 6 anos.

Métodos: Devido à emergência de diversos clones multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, a pesquisa realizada focou-se nestes três microrganismos. Para que este estudo fosse possível, realizou-se uma revisão bibliográfica de trabalhos científicos publicados, utilizando um método exploratório, crítico e interpretativo desses conteúdos. Os trabalhos analisados foram publicados entre 2010 e 2016 e realizados em países europeus. Foram utilizadas bases de dados cientificamente validadas como o caso do Pubmed.

Resultados: Relativamente a *Acinetobacter baumannii*, o clone ST2 foi o mais prevalente com resistências a carbapenemos na Europa, apresentando prevalências distintas nos diversos países europeus. O gene *bla_{OXA-23}* tem sido descrito como um gene com aumento de disseminação a nível europeu. Relativamente a *Pseudomonas aeruginosa* os clones mais prevalentes na Europa foram o clone ST235, ST111 e ST175. As enzimas VIM e IMP foram as mais disseminadas e uma nova enzima indutora de resistência aos carbapenemos foi descrita. Em *Staphylococcus aureus* as estirpes dividem-se em HA-MRSA e CA-MRSA; referente a HA-MRSA os clones ST22, ST125 e ST5 foram os mais prevalentes, enquanto em estirpes CA-MRSA os clones mais predominantes foram ST8 e ST80.

Conclusões: A emergência de estirpes multirresistentes e a sua disseminação, é um problema atual e relevante. Os estudos analisados sugerem que ao longo dos anos a prevalência e emergência de diversos clones multirresistentes e respetivos genes de resistência associados é cada vez maior, reforçando para uma necessidade na implementação de medidas de controlo infeccioso.

Palavras-chave: clones, multirresistência, disseminação, Europa

ABSTRACT

Objective: Given the current context of emergence of multiresistant bacterial clones, we proposed to do an investigation in order to understand the prevalence of multiresistant bacterial strains and their dissemination in Europe in the last 6 years.

Methods: Due to the emergence of several multiresistant clones of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, our research focused on these three microorganisms. For this study, a bibliographic review of published scientific works was carried out using an exploratory, critical and interpretative method of these contents. The scientific articles analyzed were published between 2010 and 2016 and carried out in European countries. Scientifically validated databases such as Pubmed were used

Results: Regarding to *Acinetobacter baumannii*, clone ST2 was the most prevalent clone with carbapenem resistance in Europe, presenting distinct rates in several European countries. The *bla_{OX4-23}* gene has been described as a gene with increased spread in European countries. Regarding to *Pseudomonas aeruginosa* the clones most prevalent in Europe were clone ST235, ST111 e ST175. The enzymes VIM and IMP are the most disseminated and a new enzyme inducing resistance to carbapenems has been described. Regarding to *Staphylococcus aureus*, they are divided into HA-MRSA e CA-MRSA; for HA-MRSA, clones ST22, ST125 e ST5 were the most prevalent, while in CA-MRSA strains the most predominant clones were ST8 and ST80.

Conclusions: The emergence of multiresistant strains and their spread is a current and relevant problem. The studies analyzed suggest that over the years the prevalence and emergence of several multiresistant clones and their associated resistance genes is increasing, reinforcing the need for the implementation of infectious control measures.

Keywords: clones, multiresistance,, dissemination, Europe

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	11
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	13
1. Fenómeno de multirresistência aos antibióticos.....	13
2. Mecanismos de resistência bacteriana.....	16
2.1 Alteração da permeabilidade membranar.....	17
2.1.1 Mecanismo de efluxo.....	17
2.1.2 Redução da permeabilidade membranar.....	18
2.2 Bloqueio do acesso antibiótico ao local alvo.....	19
2.2.1 Inibição local do acesso antibiótico.....	19
2.3 Inativação ou modificação enzimática do antibiótico.....	19
2.4 Transferência genética horizontal.....	20
3. Métodos de genotipagem.....	21
3.1 Método ALFP.....	22
3.2 Método PFGE.....	22
3.3 Método MLST.....	23
3.4 Método 3LST.....	24
3.5 Método WGS.....	24
4. Estirpes bacterianas multirresistentes.....	24
4.1 Conceitos.....	24
4.1.1 Espécie bacteriana.....	25
4.1.2 Isolado bacteriano.....	25
4.1.3 Clone.....	25
4.1.4 <i>Sequence type</i>	25
4.1.5 Complexos clonais.....	25
4.1.6 Patogénico habitual.....	26
4.1.7 Terminologia MDR, XDR e PDR.....	26
4.2 Contextualização.....	27
5. <i>Acinetobacter baumannii</i>.....	27
5.1 Microbiologia.....	27

5.2 Clínica.....	29
6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
6.1 Microbiologia.....	30
6.2 Clínica.....	31
7. <i>Staphylococcus aureus</i>	33
7.1 Microbiologia.....	33
7.2 Clínica.....	36
CAPÍTULO II: METODOLOGIA.....	38
CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	39
1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	39
1.1. Resistências descritas.....	43
1.2. Resistência aos carbapenemos.....	44
1.3. Resistência à colistina.....	48
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
2.1. Resistências descritas.....	57
2.2. Resistências aos carbapenemos.....	59
2.3. β -lactamases adquiridas de forma horizontal.....	62
2.4. Sistema de secreção tipo III.....	63
2.5. Utilização de bacteriófagos.....	64
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	65
3.1. Resistências descritas.....	69
3.2. Resistências associadas a estirpes HA-MRSA e CA-MRSA.....	69
3.3. Gene <i>mecC</i>	73
3.4. Estirpes MRSA em pacientes imunocomprometidos.....	74
3.5. <i>Livestock-associated</i> MRSA.....	75
3.6. Resistência à vancomicina.....	76
3.7. Resistência à linezolida.....	77
3.8. Estudo de monitorização repetitivo.....	78
CAPÍTULO IV: CONCLUSÕES.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo das diversas consequências provenientes da infecção por um microrganismo MDR.....14

Figura 2. Esquema ilustrativo dos diversos mecanismos de resistência em isolados bacterianos multirresistentes.....15

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> realizados na Europa nos últimos 6 anos.....	39
Tabela 2. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> na Europa nos últimos 6 anos.....	40
Tabela 3. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Acinetobacter baumannii</i> na Europa nos últimos 6 anos.....	41
Tabela 4. Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> realizados na Europa nos últimos 6 anos.....	49
Tabela 5. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na Europa nos últimos 6 anos.....	50
Tabela 6. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na Europa nos últimos 6 anos.....	51
Tabela 7. Resumo das β -lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST235 e respetivo país de isolamento (Oliver, Mulet, López-Causapé, & Juan, 2015).....	52
Tabela 8. Resumo das β -lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST111 e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).....	53
Tabela 9. Resumo das β -lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST175, ST244 e ST357 e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).....	54
Tabela 10. Resumo das β -lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST233, ST274 e ST308 e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).....	55
Tabela 11. Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> realizados na Europa nos últimos 6 anos.....	65
Tabela 12. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> realizados na Europa nos últimos 6 anos.....	66
Tabela 13. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de <i>S. aureus</i> realizados na Europa nos últimos 6 anos.....	67

Tabela 14. Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *S. aureus* realizados na Europa nos últimos 6 anos.....67

Tabela 15. Os 20 *spa types* mais frequentemente isolados de estirpes MSSA e MRSA, num estudo realizado em 25 países europeus, no ano de 2011 (Grundmann et al., 2014).....79

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAC: aminoglicosídeos acetiltransferases

ABC: *ATP – binding cassette*

ALFP: *amplified fragment length polymorphism*

AMES: *aminoglycoside-modifying enzymes*

APH: *aminoglycoside phosphoryltransferase*

ATP: adenosina trifosfato

CL: *clonal lineages*

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CRAB: *Carbapenem – Resistant Acinetobacter baumannii*

CRPA: *Carbapenem - Resistant Pseudomonas aeruginosa*

DMT: *drug/metabolite transporter*

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EC: *European clone*

IACS: Infeções associadas aos cuidados de saúde

IC: *International clone*

IPTM: Infeções da pele e dos tecidos moles

MATE: *multidrug and toxic compound extrusion*

MβLs: metalo – β – lactamases

MMR: microrganismo multirresistente

MDR: *multidrug resistant*

MDPA: *multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa*

MFS: *major facilitator superfamily*

MLST: *multilocus sequence typing*

PAV: *Pneumonia associada a um ventilador*

PDR: *pandrug resistant*

PFGE: *pulsed-field gel electrophoresis*

RND: *resistance-nodulation-division*

SG: *sequence groups*

XDR: *extensive-drug resistant*

WGS: *whole-genome sequencing*

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. Fenómeno de multirresistência aos antibióticos

A emergência e a disseminação de bactérias multirresistentes é atualmente uma problemática que origina uma grande preocupação (Potron, Poirel, & Nordmann, 2015).

Como já é do conhecimento da comunidade científica e por parte dos técnicos de saúde, o fenómeno da multirresistência a antibióticos (Nikaido, 2010) é um problema de saúde pública à escala mundial e que tem vindo a crescer exponencialmente. Estima-se que nos últimos anos a prevalência de isolados bacterianos multirresistentes tenha quadruplicado a nível mundial (Basak, Singh, & Rajurkar, 2016) e que na Europa, cerca de 25 mil indivíduos morram por ano por infeções associadas a estes microrganismos (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015).

Este fenómeno deve-se ao facto de por vezes as bactérias (de Gram-positivo ou de Gram-negativo) adquirirem a capacidade de resistir à grande maioria ou até a todas as classes de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2011). O desenvolvimento de tais resistências por bactérias patogénicas para o Homem, representa um dos maiores desafios nas práticas médicas modernas (Bennett, 2008). Este problema torna-se ainda mais assustador tanto para os profissionais de saúde como para os doentes, considerando que existe apenas um número bastante limitado de novas opções antimicrobianas a serem desenvolvidas (Magiorakos et al., 2011).

Segundo o Serviço Nacional de Saúde (SNS), a resistência aos antibióticos acontece quando um antibiótico deixa de ter capacidade de provocar a morte da população bacteriana, ou de pelo menos controlar o seu crescimento. Este fenómeno de perda de capacidade pode ocorrer quando uma bactéria possui ou adquire características fenotípicas e genotípicas específicas (Li, Plésiat, & Nikaido, 2015), como mecanismos de resistências naturais ou adquiridos, deixando assim de ser suscetível a determinado antibiótico ou agente quimioterapêutico. É importante denotar que um isolado de determinadas bactérias apenas é considerado resistente a um determinado agente ou classe terapêutica quando este facto pode ser comprovado por dados interpretativos estabelecidos previamente por entidades como o Comité Europeu do teste à suscetibilidade aos antibióticos (EUCAST) ou Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (Magiorakos et al., 2011).

Muitas vezes, a perda de suscetibilidade, ocorre devido ao uso incorreto e/ou excessivo da terapêutica antimicrobiana, aumentando a possibilidade de múltiplas estirpes patogênicas se tornarem resistentes não só a uma classe, mas a várias classes de antibióticos e/ou agentes quimioterapêuticos, surgindo assim o conceito de multirresistência aos antibióticos (Nikaido, 2010). Este conceito de multirresistência corrobora a definição fornecida pelo SNS, definindo-se como a falta de sensibilidade ou resistência de um microrganismo aos agentes antibióticos utilizados apesar de uma possível anterior suscetibilidade aos mesmos (Tanwar, Das, Fatima, & Hameed, 2014).

Na grande maioria das vezes, as infecções por microrganismos resistentes aos antibióticos surgem associadas aos cuidados de saúde (IACS). Neste meio, os microrganismos multirresistentes podem colocar em risco vastos procedimentos médicos (Bennett, 2008), condicionar a terapêutica adequada (Woodford, Turton, & Livermore, 2011), a própria medicina e a eficiência no tratamento de pacientes imunocomprometidos (Potron et al., 2015).

Apesar da multirresistência aos antibióticos ser vista como um fenômeno de desenvolvimento natural por parte das bactérias, esta condição é de particular importância para pacientes imunocomprometidos tais como: VIH - positivos, doentes que sofreram transplante de órgãos, doentes oncológicos, doentes que sofreram extensas queimaduras corporais, entre outros, e assim propensão para a aquisição de doenças infecciosas. Por se encontrarem nesta condição, facilitam a propagação de microrganismos multirresistentes (MMR) em meio hospitalar (Tanwar et al., 2014).

Ao contrário do que se possa pensar, a resistência antibiótica não afeta apenas a escolha terapêutica a ser instituída no doente. Esta condição encontra-se intimamente associada com elevadas taxas de mortalidade e morbidade e elevados custos de tratamento, por ser necessário instituir terapêuticas alternativas mais dispendiosas. Além disso, uma infecção por um MMR constitui um problema no controle de doenças infecciosas, por aumentar a possibilidade de propagação de agentes patogênicos resistentes (Tanwar et al., 2014). A Figura 1, ilustra as diversas consequências de uma infecção por um microrganismo MDR.

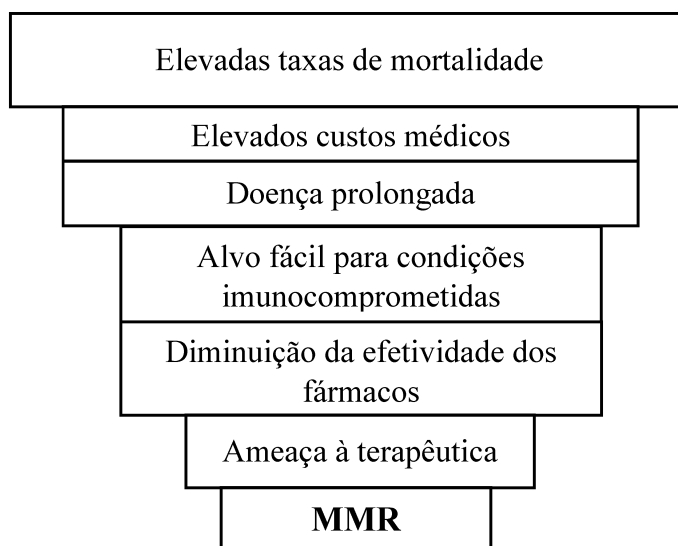


Figura 1 - Esquema ilustrativo das variadas consequências provenientes da infecção por um MMR. Adaptado de (Tanwar et al., 2014).

Atualmente, a resistência aos antibióticos apresenta-se como uma ameaça que conduz ao aumento da mortalidade e da morbidade, aumento da estadia no hospital e severos gastos económicos para o paciente e para os estados (Basak et al., 2016).

Além dos variados mecanismos de resistência utilizados, as bactérias expressam igualmente fatores de virulência específicos e respetivas determinantes, o que pode acabar por justificar as diferenças nas taxas de mortalidades causadas pelo mesmo clone de um microrganismo em diferentes patologias (Antunes, Visca, & Towner, 2014).

De certo modo, pensa-se que o sucesso global das infeções por bactérias patogénicas é determinado por uma relação entre: patogenicidade, epidemiologia e resistência antibiótica. Crê-se que os principais elementos para esta equação se baseiem sobretudo numa engenharia genética natural que liga os determinantes de resistência antibiótica com o sucesso dos clones (Oliver, Mulet, López-Causapé, & Juan, 2015).

2. Mecanismos de resistência bacteriana

As bactérias multiresistentes conseguem hospedar diversos elementos genéticos conferidores de resistência, como genes, plasmídeos e transposões (Woodford et al., 2011).

As bactérias podem ser resistentes a determinado antibiótico, de duas formas: natural ou através da aquisição de resistência (Barroso, Meliço - Silvestre, & Taveira, 2014). A resistência natural ou intrínseca é resultado de características estruturais e funcionais, e pode ser específica para determinada bactéria. Por sua vez, a resistência adquirida aos antibióticos pode ser desenvolvida através de mutações espontâneas em genes cromossomais, ou adquirida através da aquisição de material genético novo por transferência genética horizontal, por meio de plasmídeos ou transposões (Blair et al., 2015), a qual pode acontecer entre espécies diferentes (Friães et al., 2014). As mutações nos genes cromossomais podem alterar o DNA pré-existente através de deleções e inversões (Bennett, 2008).

Deste modo, as bactérias podem utilizar diversos mecanismos no desenvolvimento de resistência a antibióticos, que podem ser divididos em três grupos principais: através da alteração da permeabilidade membranar, pela inativação ou modificação do antibiótico por ação enzimática, ou através do bloqueio do acesso do antibiótico ao local alvo (Blair et al., 2015).

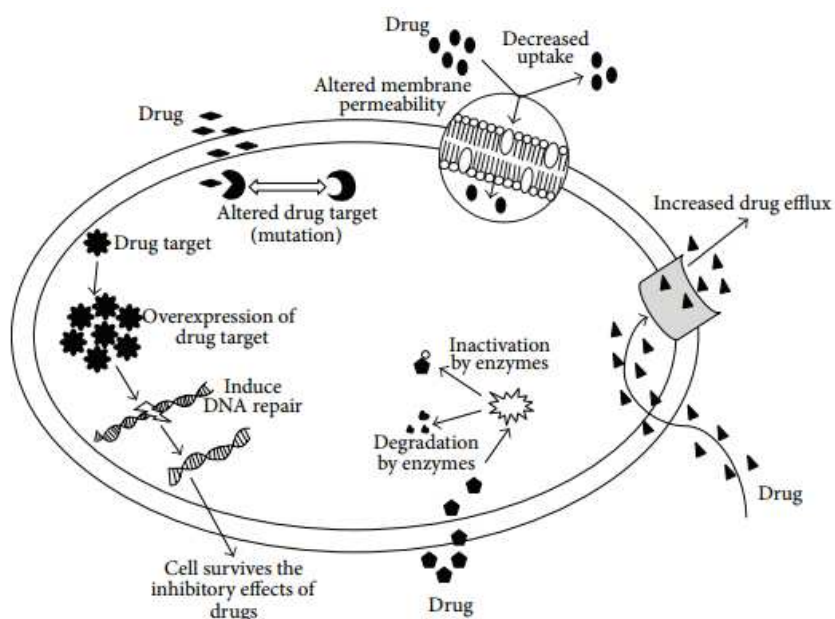


Figura 2 – Esquema ilustrativo dos diversos mecanismos de resistência em isolados bacterianos multiresistentes (Tanwar et al., 2014).

2.1. Alteração da permeabilidade membranar

2.1.1. Mecanismo de efluxo

O mecanismo de efluxo é um dos principais mecanismos de resistência antibiótica utilizado tanto por bactérias de Gram-negativo como de Gram-positivo (Li et al., 2015).

As bombas de efluxo bacterianas são proteínas transportadoras envolvidas no transporte ativo de diversos antibióticos, do citosol ou periplasma bacteriano, para o exterior da célula (Webber & Piddock, 2003);(Blair et al., 2015). Os genes que as codificam podem encontrar-se localizados tanto nos cromossomas como em plasmídeos (Sun, Deng, & Yan, 2014). Um plasmídeo é uma molécula circular de DNA em dupla hélice, capaz de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico bacteriano (Bennett, 2008).

Este mecanismo foi descoberto em bactérias de Gram-negativo através da presença da proteína Tet (A) (Nikaido, 2010) e é utilizado como mecanismo de resistência intrínseco nestas bactérias a muitos dos antibióticos utilizados no tratamento de bactérias de Gram-positivo (Blair et al., 2015).

De acordo com diversos fatores como: fontes de energia, substratos, número de regiões transmembranares abrangentes e composição, estes sistemas podem ser divididos em 5 famílias: a família RND, a família MFS, a família ABC, a família DMT e a família MATE (Sun et al., 2014).

As bombas de efluxo podem possuir especificidade face ao antibiótico que transportam para o exterior da célula (Blair et al., 2015) ou podem apresentar-se como um sistema de transporte múltiplo – além da membrana de transporte interna, possuem também uma membrana de transporte externa e um adaptador de proteínas – como é o caso das bombas de efluxo pertencentes à família RND, intimamente relacionada com a resistência antibiótica em microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* (Sun et al., 2014). As bombas de efluxo associadas a este sistema de transporte múltiplo obtêm a designação de bombas de efluxo associadas a MDR (Blair et al., 2015).

Por diversas vezes, o elevado nível de resistência apresentado por uma bactéria face a um antibiótico encontra-se relacionado com uma sobreexpressão do sistema de efluxo (Blair et al., 2015).

Em adição a este facto, a resistência clínica causada pela sobreexpressão de mais do que uma bomba de efluxo foi identificada. O sistema *MexAB - OprM* pode potenciar a saída de β -lactâmicos das células, enquanto o sistema *MexXY - OprM* pode potenciar a saída de aminoglicosídeos. Em bactérias que expressem ambos os sistemas, os β – lactâmicos e os aminoglicosídeos são constante e ativamente expulsos da célula (Sun et al., 2014).

À exceção da superfamília RND, que apenas é possível encontrar presente em bactérias de Gram-negativo, os restantes sistemas de efluxo encontram-se amplamente distribuídos tanto em bactérias de Gram-negativo como em bactérias de Gram-positivo (Sun et al., 2014), como mecanismo de resistência às tetraciclinas (Barroso et al., 2014).

Nas bactérias de Gram-positivo, as bombas de efluxo com maior significado clínico pertencem à família MFS, como por exemplo o sistema *NorA* em *Staphylococcus aureus* (Sun et al., 2014).

Este mecanismo pode ainda ser conjugado com outros mecanismos de resistência, tais como a inativação ou modificação por ação enzimática de determinados fármacos ou alterações a nível da barreira de permeabilidade da membrana, aumentando significativamente os níveis e os perfis de resistência (Li et al., 2015).

2.1.2. Redução da permeabilidade membranar

As bactérias de Gram-negativo, são intrinsecamente menos permeáveis a diversos antibióticos. Esta característica deve-se sobretudo à presença de uma membrana externa que atua como uma barreira à permeabilidade (Blair et al., 2015).

A redução da permeabilidade da membrana externa e conseqüente redução da entrada de antibióticos para a célula bacteriana é conseguida pela regulação das porinas membranares. Esta regulação pode envolver a alteração da expressão destas porinas ou uma substituição por porinas com maior seletividade (Blair et al., 2015).

Microrganismos como *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* utilizam este mecanismo como forma de resistência a cefalosporinas e principalmente a carbapenemos (Blair et al., 2015).

2.2. Bloqueio do acesso do antibiótico ao local alvo

2.2.1. Inibição local do acesso antibiótico

A inibição do local de acesso do antibiótico acontece quando determinadas enzimas se ligam com elevada afinidade aos ribossomas alterando a sua configuração, ou seja, alterando a configuração da proteína alvo; por exemplo, as enzimas Tet (M) e Tet (S), impedem a ligação das tetraciclina aos seus locais alvo (Nikaido, 2010).

2.3. Inativação ou modificação enzimática do antibiótico

Desde a descoberta da penicilinase, em 1940, a inativação ou modificação dos antibióticos por meio de enzimas é um dos mecanismos de resistência intrínseca antibiótica com maior relevância (Blair et al., 2015; Nikaido, 2010). De facto, a resistência associada à penicilina foi descrita apenas 10 anos após a sua descoberta (Kalenic, 2012).

Este mecanismo de resistência é bastante comum na resistência aos β -lactâmicos – que são inativados pela hidrólise enzimática das β -lactamases no periplasma ocorrendo a clivagem do anel β -lactâmico-, aos aminoglicosídeos – que são inativados maioritariamente por fosforilação (APH), acetilação (AAC) ou adenilação enzimática no periplasma - (Nikaido, 2010), e aos macrólidos (Blair et al., 2015).

Relativamente aos aminoglicosídeos, existem atualmente dezenas de enzimas modificadoras como a AAC (3)–II ou a AAC (6')–Ib, conhecidas como aminoglicosídeo acetiltransferases. À medida que têm sido descobertas tais enzimas, a indústria farmacêutica tem desenvolvido tanto aminoglicosídeos naturais, como sintéticos distintos dos substratos por norma inativados (Nikaido, 2010).

Tendo em conta a evolução bacteriana, as primeiras β -lactamases, cujo espectro de ação se baseava nos β -lactâmicos de primeira geração, deram lugar às β -lactamases de espectro estendido (ES β LS) (Blair et al., 2015). As ES β LS têm sido alvo de estudos frequentes, sabendo-se hoje em dia que podem ser classificadas em diversas famílias filogenéticas; as enzimas de classe A - penicilinases, enzimas de classe B – metalo- β -lactamases, enzimas de classe C - cefalosporinases, entre outras (Nikaido, 2010).

Consequentemente, nos últimos anos, com o aumento de isolados bacterianos que transportam estas enzimas, o uso de carbapenemos aumentou (Blair et al., 2015). Como

já havia sido referido, o uso excessivo de determinado agente antibiótico, pode promover a emergência de isolados bacterianos resistentes a esse antibiótico (Nikaido, 2010). Como tal, surgiram as carbapenemases (β -lactamases com atividade hidrolisante nos carbapenemos) (Blair et al., 2015).

Deste modo, as principais enzimas associadas à inativação ou modificação dos antibióticos, devido à sua prevalência, são: as ES β LS e as carbapenemases (Blair et al., 2015).

2.4. Transferência genética horizontal

O fenômeno de aquisição de genes resistentes a determinados antibióticos, é conseguido por transferência genética horizontal (Bennett, 2008).

De modo sucinto, uma bactéria consegue transferir fragmentos de DNA e elementos genéticos para outras bactérias essencialmente a partir de três métodos: conjugação, transformação e transdução. Os elementos que promovem a conjugação bacteriana são plasmídeos bacterianos e transposões (Bennett, 2008).

Os plasmídeos R – plasmídeos de resistência – são plasmídeos que transportam um ou mais genes de resistência e são eficientemente transferidos para células que ainda sejam suscetíveis a determinado antibiótico (Nikaido, 2010).

A grande maioria dos plasmídeos de resistência codifica para funções necessárias que conduzem à transferência de DNA entre células bacterianas, incluindo a transferência de si próprio (Bennett, 2008).

Nos últimos anos, tem sido considerada a hipótese de que atualmente a transferência de plasmídeos R entre células bacterianas acontece através do Sistema de Secreção Tipo IV. Este sistema consiste na identificação de uma sequência específica de DNA circular em dupla hélice e posterior corte da mesma. De modo a que existam tanto na célula dadora como na célula recetora, plasmídeos R completos, existe um mecanismo de replicação em círculo em ambas as células, que permite a reconstituição da dupla hélice do DNA (Nikaido, 2010).

Deste modo, apesar de inicialmente terem sido identificadas a nível cromossomal, as β -lactamases com atividade contra os carbapenemos (carbapenemases), codificadas por genes de resistência podem facilmente ser mediadas por plasmídeos e/ou transposões

(Kempf & Rolain, 2012) e têm sido reportadas em microrganismos como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (Blair et al., 2015; Nikaido, 2010).

Esta capacidade de transferência genética horizontal, fornece à espécie a possibilidade de adaptação a diferentes situações tanto no meio ambiente como no ser humano, ou seja, podem apresentar-se como agentes inofensivos quando parte da flora normal do hospedeiro, mas também podem apresentar-se como agentes patogênicos possibilitando infecções severas (Kalenić, 2012).

3. Métodos de genotipagem

Durante as últimas décadas e face à emergência de estirpes multirresistentes, a genotipagem molecular tem-se tornado uma ferramenta de enorme importância nos estudos epidemiológicos (Lindstedt et al., 2012).

Vários métodos têm sido utilizados com o intuito de identificar genotipicamente as estirpes bacterianas (Durmaz et al., 2009). Dos diversos métodos de tipagem molecular existentes, destacam-se os métodos: *amplified fragment length polymorphism* (ALFP), *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *multilocus sequence type* (MLST), *tri-locus sequence typing* (3LST) e *whole genome sequence* (WGS) (Zarrilli, Pournaras, Giannouli, & Tsakris, 2013).

As diversas técnicas têm sido utilizadas essencialmente por dois motivos: por apresentarem resultados independentes da origem do isolado bacteriano ou da taxa de disseminação da infecção na população estudada e por puderem ser usadas na avaliação e desenvolvimento de medidas preventivas (Durmaz et al., 2009). Além disso, é de extrema importância que estirpes responsáveis por surtos infecciosos sejam rapidamente identificadas (Larsen et al., 2012).

Após a recolha de um isolado bacteriano, executa-se em primeiro lugar, na quase totalidade dos casos, testes de suscetibilidade antibiótica (TSA). Estes testes são feitos de acordo com as normas estabelecidas pelo EUCAST (Magiorakos et al., 2011). Tendo em conta que os perfis de suscetibilidade podem variar, o antibiograma é vital na instituição de uma terapêutica apropriada (Barroso et al., 2014).

3.1. Método ALFP

As técnicas baseadas em *polymerase chain reaction* (PCR) são técnicas rápidas, eficientes e com elevada reprodutibilidade (Cramer, Wiehlmann, & Tummler, 2010).

O método AFLP é um método para detetar polimorfismos no DNA, baseado em PCR *fingerprinting*, utilizado para amplificar fragmentos genómicos de indivíduos simultaneamente. É um método largamente descrito e apesar dos diversos protocolos reportados, existem quatro passos fundamentais que são constantes: restrição do DNA genómico, amplificação seletiva por PCR, separação dos fragmentos amplificados por eletroforese e interpretação dos dados obtidos (Paun & Schönswetter, 2012).

As grandes vantagens deste método são: elevada sensibilidade, elevada reprodutibilidade, utilização de pequenas quantidades de amostra, não ser necessário conhecer a sequência genómica previamente, e a capacidade em gerar rapidamente elevadas quantidades de fragmentos para qualquer microrganismo (Paun & Schönswetter, 2012).

Contudo, os produtos gerados, dependem das condições da reação de PCR. Deste modo, a identificação clonal de isolados de datas diferentes gerados por laboratórios diferentes, não é comparável (Cramer, Wiehlmann, & Tummler, 2010).

3.2. Método PFGE

Apesar de, métodos baseados em PCR e em sequenciação serem atualmente bastante utilizados devido ao seu carácter mais simples (Ahmed & Alp, 2015), e por serem apropriados para estudos epidemiológicos de larga escala e para filogenia de estirpes bacterianas (Zarrilli et al., 2013), o método PFGE é atualmente considerado como um dos métodos *gold standard* da genotipagem (Ahmed & Alp, 2015).

Este método consiste na digestão de DNA genómico por enzimas de restrição, e posteriormente separação dos fragmentos de DNA por ação de um campo elétrico pulsado (Ahmed & Alp, 2015).

Este método continua a ser adotado como um dos métodos de referência para surtos causados por estirpes de *A. baumannii* (Zarrilli et al., 2013).

Para isolados de *P. aeruginosa*, esta técnica era considerada, até há pouco anos, como a *gold - standard* para a genotipagem. É uma técnica indicada para estudar surtos

locais até algumas dezenas de isolados, mas é inapropriada para estudos longitudinais ou transversais de infecções por este microrganismo. No entanto esta técnica é incapaz de fornecer dados comparativos, devido ao seu carácter variável, impossibilitando a comparação entre laboratórios e entre estudos (Cramer et al., 2010).

3.3. Método MLST

Quando assim se justifica, após a identificação da espécie bacteriana e das resistências associadas, utiliza-se a técnica *multilocus sequence type* (MLST) para identificação genotípica do isolado bacteriano, por ser considerada a técnica *gold – standard* em genotipagem molecular (Larsen et al., 2012). Este método relativamente recente, surge como alternativa ao método PFGE (Ahmed & Alp, 2015).

O princípio base por detrás desta técnica consiste na sequenciação de fragmentos internos de aproximadamente 400 a 500 pares de bases (pb) de sete genes *housekeeping* (Larsen et al., 2012; Seidl et al., 2015) e foi inicialmente desenvolvido em 1998 para investigação da estrutura populacional e epidemiológica bacteriana (Zarrilli et al., 2013) e principalmente para ultrapassar a pobre reprodutibilidade entre laboratórios para a espécie *Neisseria meningitidis* (Larsen et al., 2012).

Para a tipagem de *A. baumannii* existem duas bases de dados MLST – PubMLST e Pasteur’s MLST – que contam com apenas três locus em comum. A base de dados PubMLST inclui atualmente 630 isolados de *Acinetobacter* distintos, mas demonstrou ser inutilizável na tipagem de alguns isolados. Por sua vez, a base de dados Pasteur’s MLST, mais recente, inclui 587 isolados de *Acinetobacter*, passíveis de serem utilizados para comparação (Zarrilli et al., 2013).

MLST é considerado um método de genotipagem de alta resolução, que surge como vantagem face a outros métodos baseados em PCR e PFGE (Cramer et al., 2010), por possibilitar a partilha em bases de dados e a comparação entre laboratórios dos dados obtidos devido ao seu elevado poder discriminatório (Ahmed & Alp, 2015).

Para além deste método, as estirpes MRSA têm sido simultaneamente identificadas por *spa* typing e *SCCmec* typing (Oksuz et al., 2013).

Apesar das suas vantagens, este método é simultaneamente dispendioso e demorado, pelo que consoante o microrganismo a investigar, poderá ser mais proveitoso a utilização de outras técnicas (Larsen et al., 2012).

3.4. Método 3LST

O método *tri-locus sequence typing* (3LST), por sua vez, é um método que envolve a amplificação e posterior sequenciação de três genes – *ompA*, *csuE* e *blaOXA-51-like* –, e tem sido utilizado para identificar linhagens clonais (CL) associadas a infecções por estirpes de *A. baumannii*, (Zarrilli et al., 2013).

3.5. Método WGS

As técnicas de genotipagem mais recentes como PFGE e MLST são bastante bem-sucedidas em identificar, comparar e revelar relações entre os diferentes isolados bacterianos da mesma espécie, como por exemplo, isolados de *A. baumannii*. Contudo, estas mesmas técnicas têm sido incapazes de identificar e resolver, em surtos de pequena escala e onde as formas de transmissão são desconhecidas e inconclusivas, diferenças entre isolados intimamente relacionados (Zarrilli et al., 2013).

O método WGS é um método rápido e acessível que permite não só uma investigação detalhada das diferenças genéticas entre isolados bacterianos pertencentes a uma mesma espécie, como também fornece informação sobre a natureza das mudanças genéticas entre isolados bacterianos sob a mesma seleção antibiótica (Zarrilli et al., 2013).

A sequenciação do genoma de estirpes de *A. baumannii* utilizando este método é bastante utilizada e foca-se sobretudo em: comparar diferentes suscetibilidades antibióticas e nos perfis MDR, e em relacionar isolados de diferentes pacientes (Zarrilli et al., 2013).

Os estudos conduzidos com a utilização deste método pretendem analisar a taxa de alterações genéticas associada com a resistência adquirida aos antibióticos, e elucidar o papel da mobilidade dos elementos genéticos na transferência de genes de resistência antibiótica entre isolados. Até agora, e de uma forma geral, os resultados apontam para uma rápida emergência de resistência a antibióticos, para alterações genéticas significativas entre isolados minimamente relacionados e para um elevado grau de plasticidade genómica (Zarrilli et al., 2013).

4. Estirpes bacterianas multirresistentes

De forma a melhor compreender os diversos temas enunciados neste trabalho, existem algumas definições que são necessárias esclarecer.

4.1. Conceitos

4.1.1. Estirpe bacteriana

Um isolado bacteriano ou um grupo de isolados que consegue ser distinto de outros isolados do mesmo grupo e da mesma espécie pelas suas características fenotípicas e genotípicas define-se como uma estirpe (Dijkshoorn, Ursing, & Ursing, 2000).

4.1.2. Espécie bacteriana

A definição de espécie bacteriana é um conceito geral aceite pela maior parte dos bacteriologistas e consiste em estirpes de origem comum que são mais semelhantes entre si do que com qualquer outra estirpe (Dijkshoorn et al., 2000).

4.1.3. Clone

O termo clone é utilizado para definir diferentes isolados bacterianos, de períodos e locais distintos, mas que mostram características fenotípicas e genotípicas tão idênticas que a única explicação para tal facto seria a de terem uma origem comum (Dijkshoorn et al., 2000). Este conceito surge em grande escala em estudos epidemiológicos.

4.1.4. *Sequence Type* (ST)

O termo *sequence type* (ST) é utilizado para descrever uma combinação única de alelos (sequências únicas) em cada *locus* estudado, aquando da utilização do método MLST (Larsen et al., 2012).

4.1.5. Complexos clonais

Um complexo clonal (CC) é definido como um grupo de STs, em que cada ST partilha pelo menos 5 a 7 alelos idênticos com outro ST do mesmo grupo (Seidl et al., 2015).

4.1.6. Patogênico habitual

Uma bactéria é considerada patogênica habitual quando apresenta fatores de virulência específicos que lhe permitam: invadir e anular as defesas do hospedeiro e causar doença (Barroso et al., 2014).

4.1.7. Terminologia MDR, XDR e PDR

A existência de uma vasta variedade de resistências adquiridas pelas bactérias levou à criação de definições para que fosse possível facilitar a caracterização de isolados bacterianos quanto às suas resistências aos antibióticos.

O conceito MDR é utilizado quando uma bactéria adquire resistência a pelo menos um agente de três ou mais classes de antibióticos utilizados na terapêutica contra essa mesma bactéria. Por sua vez, XDR é um termo aplicado a bactérias que apresentam resistência em todas as categorias antimicrobianas exceto dois ou menos antibióticos (Ciofi Degli Atti et al., 2014). Por último, PDR é definido como a resistência a todos os agentes de todas as classes antimicrobianas (Basak et al., 2016).

Para que a utilização destes conceitos seja feita de forma correta e para que estes conceitos possam ser aplicados a qualquer resultado obtido para um determinado isolado, deve ser realizado um TSA em laboratórios microbiológicos controlados (Magiorakos et al., 2011)

Por vezes, quando apenas uma reduzida quantidade de agentes antimicrobianos é testada, irá surgir dificuldade em definir e estabelecer os conceitos XDR e PDR para um determinado isolado, surgindo por sua vez os conceitos “possível XDR” ou “possível PDR”. Apesar destes conceitos não serem esclarecedores quanto à resistência e de não poderem ser comparados com conceitos semelhantes obtidos em outros estudos, devem ser utilizados como marcadores de resistência extensa aos antibióticos (Magiorakos et al., 2011)

4.2. Contextualização

A emergência e disseminação de bactérias resistentes a múltiplas classes antibióticas, especialmente patogénicos do Homem, em infeções é atualmente um problema de saúde pública a nível mundial (Glasner et al., 2015). Este facto é de grande importância tanto em meio hospitalar como na comunidade, por condicionar a medicina e as opções terapêuticas disponíveis e por norma mais apropriadas (Potron et al., 2015).

Dentro das bactérias que apresentam este perfil, destacam-se o *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, pelo seu aumento de reportação nos últimos anos, pela emergência de diferentes clones multirresistentes, e por serem frequentemente identificadas não só como microrganismos MDR, mas também como XDR e PDR. Tendo em conta estes factos, o presente trabalho focou-se em explorar as prevalências de clones multirresistentes destas espécies.

5. *Acinetobacter baumannii*

5.1. Microbiologia

A. baumannii é um cocobacilo de Gram-negativo, não fermentador de glucose, estritamente aeróbio, catalase positivo e oxidase negativo (Barroso et al., 2014). Foi descrito pela primeira vez como uma espécie independente do género *Acinetobacter* no ano de 1986 (Ali, Botha, & Tiruvoipati, 2014). Ao longo dos anos sofreu alterações a nível taxonómico, sendo atualmente da ordem Pseudomonadales e membro da família Moraxellaceae. Apesar de nos anos 60 ser considerado um microrganismo com baixa patogenicidade (Kempf & Rolain, 2012), é atualmente considerado um microrganismo patogénico, ou seja capaz de causar doença, e oportunista, responsável por cerca de 2-10% de todas as infeções hospitalares causadas por microrganismos de Gram-negativo. A severidade das infeções causadas varia de acordo com a estirpe que causou a infeção e de acordo com a própria infeção que ela provocou, podendo as taxas de mortalidade variar entre 8-35% (Antunes et al., 2014).

Historicamente, infeções provocadas por esta bactéria só começaram a ser consideradas um problema significativo no início dos anos 70, tendo em conta que até tal data a grande maioria das estirpes era sensível aos antibióticos por norma utilizados (Antunes et al., 2014). Surtos por este microrganismo, são observados apenas dez anos

mais tarde, nos anos 80, em países europeus como França, Alemanha, Espanha, Itália, entre outros (Kempf & Rolain, 2012). Desde então, e até à atualidade, a importância de *A. baumannii* tem vindo a aumentar de forma gradual, sendo hoje em dia classificado, segundo a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, como um dos seis patogénicos MDR de maior importância a nível hospitalar, responsáveis por uma elevada morbidade e mortalidade entre pacientes (Qureshi et al., 2015).

Este microrganismo apresenta elevada resistência intrínseca a diversas classes antimicrobianas e apresenta intrinsecamente duas β – lactamases no seu genoma: uma AmpC β -lactamase e uma oxacilinase. Contudo, a sua importância clínica tem crescido, particularmente, durante a última década (Kempf & Rolain, 2012), devido à sua capacidade em adquirir resistência a múltiplas classes de antibióticos, o que conduziu a uma redução nas opções terapêuticas utilizadas (Ahmed & Alp, 2015; Qureshi et al., 2015), sendo descrito com frequência, nos últimos dez anos, estirpes MDR, XDR e PDR.

Contudo, ainda não se encontra totalmente esclarecido se determinadas estirpes epidémicas são importantes para a aquisição de fenótipos MDR, ou se os fenótipos MDR são importantes para estirpes individuais se tornarem epidémicas (Antunes et al., 2014).

Esta rápida emergência a nível mundial de estirpes de *A. baumannii* resistentes a todos os β - lactâmicos, incluindo os carbapenemos, mostra a extraordinária capacidade adaptativa desta bactéria face à pressão seletiva do meio (Kempf & Rolain, 2012).

A. baumannii causa doença no organismo humano associando esta capacidade de desenvolver mecanismos de resistência à grande maioria das classes terapêuticas existentes, ao tipo de interação estabelecida com o doente e com a sua persistência no ambiente de saúde (Perez et al., 2007). Este microrganismo, é capaz de promover surtos infecciosos intra e inter-hospitalares e de disseminar determinados clones de forma eficiente a nível internacional (Karah, Sundsfjord, Towner, & Samuelson, 2012).

É sempre necessário um juízo clínico cuidado de forma a separar os casos de infeção dos casos de colonização nosocomial, tendo em conta que, ao contrário do que acontece com a infeção, deve evitar-se o tratamento de casos de colonização (Cunha, 2016)

Estudos comparativos feitos a estirpes envolvidas em surtos infecciosos, identificaram geograficamente a elevada ocorrência e a taxa de sucesso de três clones

diferentes em hospitais Europeus, dando-lhes inicialmente a designação de clones Europeus *EC* I-III. Em estudos realizados posteriormente, estes clones foram identificados a nível mundial tendo a sua designação sido alterada para clones internacionais *IC* I-III. O aparecimento de tais clones aparenta ter um importante papel no aumento da ocorrência de infeções por *A. baumannii* (Karah et al., 2012).

5.2. Clínica

Este microrganismo é atualmente reconhecido como um dos principais responsáveis por infeções adquiridas a nível hospitalar (Antunes et al., 2014). Contudo, este agente patogénico pode, ainda que de forma menos comum, causar infeções a nível comunitário.

Dentro das infeções nosocomiais, destacam-se as infeções da corrente sanguínea e as pneumonias associadas à utilização de um ventilador (PAV) (Kempf & Rolain, 2012). Outras infeções ocorrem a nível da pele e dos tecidos moles (IPTM), feridas (Ali et al., 2014), trato urinário e meningite secundária, mas de um modo menos frequente (Antunes et al., 2014). *A. baumannii* pode facilmente entrar em contato com a corrente sanguínea através de feridas abertas, ventiladores ou através de um cateter (Kempf & Rolain, 2012). Apresentando-se como um agente patogénico oportunista infeta sobretudo doentes imunodeprimidos que: sofram de alguma doença debilitante, tenham estado sujeitos a procedimentos cirúrgicos extensos e hospitalizados durante um grande período de tempo. Para além disso, encontra-se mais associado ao sexo masculino e a uma idade mais avançada (Antunes et al., 2014).

As IPTM, principalmente celulite severa, provocadas por *A. baumannii*, são associadas a elevadas taxas de mortalidade independentemente da instituição de um tratamento apropriado (Ali et al., 2014).

Por outro lado, os isolados desta bactéria podem causar bacteriémia, pneumonia, infeções nos olhos, e ainda endocardite. Ao contrário do que acontece com as IACS, estas infeções encontram-se mais associadas a idades avançadas, ao alcoolismo, tabagismo, Diabetes Mellitus, doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e doença renal (Antunes et al., 2014). Foi descoberto que três fatores determinam o prognóstico de pacientes com bacteriémia provocada por *A.baumannii* resistentes aos carbapenemos (CRAB): as características específicas do género da bactéria, as características do paciente e a severidade da doença (Nutman et al., 2014).

De um modo geral, não é possível afirmar que uma infecção por *A. baumannii* adquirida em meio hospitalar seja mais severa e com maiores taxas de mortalidade que uma infecção adquirida na comunidade (Antunes et al., 2014).

Curiosamente, tem sido notada a existência de um fenómeno associado a este microrganismo; baseia-se no facto de terem surgido diversas infeções, derivadas de ferimentos, em zonas de conflito tanto no Iraque como no Afeganistão. Tem sido posta a hipótese que o uso de morfina nos doentes com ferimentos de combate possa potenciar as infeções por *A. baumannii*, possivelmente como resultado do seu efeito imunodepressor. Contudo, esta maior predisposição para infeções ainda não pode ser associada ao uso de morfina, tendo em conta que as mesmas podem ser um reflexo da pressão extrema que se vive nos hospitais desses locais, em que muitas das vezes as precauções e o controlo das infeções, se encontra diminuído (Antunes et al., 2014).

6. *Pseudomonas aeruginosa*

6.1. Microbiologia

P. aeruginosa é um bacilo de Gram-negativo de forma linear ou ligeiramente curva, flagelado, não fermentador de lactose, oxidase positivo e aeróbio (Barroso et al., 2014). Pertence à ordem Pseudomonadales e à família Pseudomonadaceae.

É mundialmente considerado um microrganismo oportunista patogénico tão importante, de tal modo que é raro o tecido imunocomprometido que o mesmo não infete, ao contrário do que acontece com os tecidos saudáveis em indivíduos sãos (Gillespie & Hawkey, 2006).

Possui necessidades nutricionais muito simples e reduzidas, podendo o seu crescimento ser observado em várias soluções aquosas, como soro, água destilada, antissépticos, colírios, piscinas e até em desinfetantes (Gillespie & Hawkey, 2006). Deste modo, pode ser isolado de amostras de água, solo, plantas, animais e do ser humano. Tem sido isolado de superfícies inorgânicas hospitalares completamente distintas, desde ventiladores a equipamentos de intubação (Olivares et al., 2013).

Além das suas necessidades nutritivas reduzidas é tolerante a uma grande variedade de condições físicas, incluindo a temperatura. A sua temperatura ótima de crescimento é 37 graus, contudo possui capacidade para crescer até 42 graus, o que a

distingue em meio laboratorial das restantes espécies de *Pseudomonas*. Em adição, são distintas das restantes bactérias pela cor verde característica das culturas, resultante da associação do pigmento pioverdina com o pigmento piocianina (Barroso et al., 2014).

P. aeruginosa é um dos agentes infecciosos de maior relevância na atualidade, capaz de causar infeções oportunistas no ser humano (Oliver et al., 2015).

De forma sintética, a versatilidade para sobreviver com as mínimas condições nutritivas, tolerância a condições adversas e capacidade de combinar diferentes mecanismos de resistência, faz desta bactéria um dos mais importantes agentes patogénicos oportunistas nosocomiais (Olivares et al., 2013), tendo estudos recentes comprovado a aplicação da terminologia MDR, XDR e PDR (Viedma et al, 2012).

6.2. Clínica

P. aeruginosa existe naturalmente no ambiente, encontrando-se frequentemente associada a infeções no ser humano (Streeter & Katouli, 2016) com gravidade variável consoante o órgão infetado (Barroso et al., 2014). É capaz de causar um largo espectro de infeções quando as funções fisiológicas normais se encontram debilitadas, incluindo neutropenia e alteração da *clearance* do muco (Streeter & Katouli, 2016).

Tal como acontecia com *A. baumannii*, é simultaneamente responsável por infeções do trato respiratório e por infeções sanguíneas nosocomiais (Ciofi Degli Atti et al., 2014). É uma das mais frequentes e severas causas de IACS agudas em pacientes imunocomprometidos ou internados em unidades de cuidados intensivos (UCI) (Oliver et al., 2015; Potron et al., 2015).

A nível hospitalar causa com frequência infeções do trato respiratório e do trato urinário. A nível do trato respiratório, é mundialmente conhecida pela sua capacidade em colonizar de forma permanente as vias respiratórias de doentes com fibrose cística, originando infeções crónicas (Streeter & Katouli, 2016). A presença de muco altamente viscoso, associado à presença de cápsulas constituídas por alginato (Barroso et al., 2014), nas vias aéreas, característica essencial desta doença, causa obstrução, promovendo a colonização por este microrganismo (Streeter & Katouli, 2016).

Doentes que não sofram de fibrose cística, podem também sofrer colonização do trato respiratório (Streeter & Katouli, 2016), especialmente doentes com outras patologias

como a DPOC, sendo considerado o microrganismo mais severo e frequente tanto em fibrose cística, como na DPOC, e bronquiectasias (Oliver et al., 2015).

A nível respiratório é igualmente um agente causador de HAP – *hospital acquired pneumonia*. Esta pneumonia é por norma adquirida através do uso de um ventilador (PAV) (Streeter & Katouli, 2016), sendo o agente patogénico nº1 causador de PAV, associado a uma taxa de mortalidade superior a 30% (Oliver et al., 2015).

A nível do trato urinário, causa infeções especialmente em indivíduos com cateteres (Barroso et al., 2014), devido à presença de biofilmes bem estabelecidos, como forma de entrada. Além deste dispositivo médico, também outros podem ser associados a infeções por este microrganismo, nomeadamente a realização de procedimentos cirúrgicos (Streeter & Katouli, 2016). Os dispositivos médicos contaminados, as fontes ambientais e a transmissão de indivíduo para indivíduo são os principais fatores para a emergência de surtos nosocomiais por este microrganismo (Ali et al., 2014).

ITPM, como feridas e queimaduras, são igualmente reportadas em meio hospitalar e revelam elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Em adição, este microrganismo pode disseminar-se a partir do seu local primário de infeção e entrar na corrente sanguínea, provocando septicémia, conduzindo novamente a um aumento das elevadas taxas de mortalidade (Streeter & Katouli, 2016). A septicémia é caracterizada por lesões escuras na pele e encontra-se associada a indivíduos por norma imunocomprometidos (Barroso et al., 2014).

A nível comunitário, as infeções mais frequentes incluem foliculite, endocardite, pneumonia (Barroso et al., 2014), otites externas superficiais e infeções da córnea. Está descrita como a bactéria mais devastadora da córnea, onde produz ulceração e queratite (Gillespie & Hawkey, 2006). Associado ao facto de *P. aeruginosa* conseguir multiplicar-se em soluções de limpeza de lentes de contato, infeções da córnea ocorrem preferencialmente em indivíduos com utilização prolongada de lentes de contacto, devido à abrasão corneana provocada pelas mesmas (Streeter & Katouli, 2016).

Para além disso pode ainda colonizar e/ou infetar o trato gastro intestinal (Ciofi Degli Atti et al., 2014).

7. *Staphylococcus aureus*

7.1. Microbiologia

S. aureus é um cocobacilo de Gram-positivo imóvel, anaeróbio facultativo, que pertence à ordem Bacillales e à família Staphylococcaceae, capsulado, coagulase positiva e catalase positiva e que expressa uma inúmera variedade de proteínas, toxinas e polissacarídeos a nível extracelular, o que contribui para a sua virulência (Barroso et al., 2014).

Apresenta-se tanto como um microrganismo comensal como um agente patogénico oportunista envolvido em infeções piogénicas e tóxicas (Oksuz et al., 2013) de sucesso tanto a nível hospitalar como a nível comunitário (Uhlemann, Otto, Lowy, & DeLeo, 2014).

Como microrganismo comensal, coloniza assintomaticamente cerca de 20-30% da população mundial (Kalenic, 2012). Os seus locais de colonização são por norma as narinas (Barroso et al., 2014) e alguns tecidos cutâneos, apesar de também poder ser encontrado nas mucosas da garganta, nas virilhas e intestinos (Kalenic, 2012). Os restantes 80% da população são colonizados intermitentemente por este microrganismo. Deste modo, portadores nasais têm sido descritos como mais predisponíveis para uma infeção, tendo em conta que por norma a estirpe que coloniza a região nasal possui exatamente o mesmo genótipo que a estirpe que infeta a mesma região (Purrello et al., 2014).

Como microrganismo patogénico, diversos fatores parecem contribuir para o seu sucesso, dentro dos quais se destacam como mais importantes: a sua capacidade para persistir como microrganismo comensal, a sua frequente multiresistência a agentes antimicrobianos e os seus diversos fatores de virulência (Uhlemann et al., 2014). Até agora, mais de 30 fatores de virulência foram descritos, estando associados a patologias clínicas particulares (Kalenic, 2012).

Este microrganismo adapta-se com extrema facilidade a condições ambientais e nutritivas diversas, como altas concentrações de sal ou baixo pH (Kalenic, 2012). Pode desenvolver-se entre temperaturas dos 18-40°C (Barroso et al., 2014), sendo que a sua temperatura ótima de crescimento é entre os 35-37°C. A transmissão deste microrganismo

ocorre preferencialmente por contato direto, contudo, esta bactéria pode sobreviver por longos períodos em objetos (Simões et al., 2011).

A elevada frequência de genes de resistência e a sua capacidade em transferi-los de forma horizontal para outros microrganismos, foi comprovada por estudos onde foram completamente sequenciados genomas de aproximadamente dez estirpes de *S. aureus*, que demonstraram um elevado número de elementos genéticos móveis (Kalenic, 2012). Esta capacidade confere em primeiro lugar, a possibilidade de isolados inicialmente suscetíveis adquirirem resistência aos antibióticos por norma utilizados (Purrello et al., 2014). De facto, a resistência à penicilina foi descrita apenas dez anos após a sua introdução nas práticas clínicas. Atualmente, quase 100% das estirpes de *S. aureus* produzem β -lactamases capazes de bloquear a ação da penicilina. Na mesma linha de pensamento, apenas um ano após a introdução da meticilina na prática clínica, a primeira estirpe de resistência a este antibiótico foi isolada de sangue de um doente com bacteriemia no Reino Unido (Kalenic, 2012). A meticilina é um antibiótico β -lactâmico e como tal atua pela inibição das PBPs que se encontram envolvidas na síntese do peptidoglicano (Stapleton & Taylor, 2007). A resistência a este antibiótico é codificada pelo gene *mecA* localizado na cassette cromossomal estafilocócica – *SCCmec*, que medeia a produção de PBP (Kalenic, 2012). Foi descrito que as estirpes resistentes à meticilina apresentam tipicamente uma distribuição geográfica (Grundmann et al., 2014).

“Taking the world as a whole, MRSA was responsible for the largest epidemic of healthcare-associated infections that ever occurred in the world.” (Kalenic, 2012).

A estirpe MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina – é, como se pode deduzir da frase apresentada no parágrafo anterior, a mais frequentemente isolada em infeções nosocomiais em todo o mundo, trazendo consigo importantes taxas de mortalidade e morbidade, duração da hospitalização (Simões et al., 2011) e um elevado peso económico e político (Mendes, 2010).

A disseminação global das estirpes MRSA ocorreu essencialmente nos últimos 20 anos. Primeiramente, estas estirpes foram observadas em meio hospitalar, dando origem à sua designação HA-MRSA – *hospital-acquired MRSA*, que atualmente causam cerca de 10-12% das IACS. As estirpes com designação CA-MRSA – *community-acquired MRSA* – foram encontradas em indivíduos sem qualquer contacto anterior com

instituições de cuidados de saúde (Smith & Wardyn, 2015) e têm emergido gerando uma preocupação adicional a nível da saúde pública (Simões et al., 2011). Uma década mais tarde, indentificou-se então um terceiro tipo de MRSA associado a indivíduos que trabalhem ou que estejam em contacto com o gado: LA-MRSA - *livestock-associated MRSA* (Smith & Wardyn, 2015). Infeções MRSA em animais são particularmente importantes por atuarem como um reservatório para infeções zoonóticas em humanos (Paterson, Harrison, & Holmes, 2014).

A nível das infeções sanguíneas associadas ao meio hospitalar, os microrganismos MRSA e MSSA são a segunda causa mais frequente, estando associadas a uma estadia hospitalar mais longa e a taxas de mortalidade mais elevadas (Purrello et al., 2014).

CA-MRSA é geneticamente diferente das estirpes HA-MRSA. A distinção entre os dois grupos é pouca, tendo em conta, que nos dias de hoje, CA-MRSA apresenta elevada multiresistência e é endémico em muitos hospitais. No ano de 2011, a prevalência de HA-MRSA em Portugal era de cerca de 49.1%, sendo das mais elevadas do continente (Simões et al., 2011).

Tendo em conta o carácter resistente e hábil desta bactéria, tem-se verificado um agravamento da situação, justificada pelo aparecimento de surtos a nível comunitário e pelo aparecimento de estirpes com resistência intermédia – VISA – ou completa à vancomicina - VRSA (Mendes, 2010). O termo VISA descreve estirpes que apresentam um aumento da concentração mínima inibitória (CMI) e consequentemente uma diminuição da suscetibilidade à vancomicina em estirpes MRSA (Gardete & Tomasz, 2014). As precursoras das estirpes VISA são as hetero-VISA (hVISA), que apresentam resistência intermédia heterógena à vancomicina (Matsuo, Cui, Kim, & Hiramatsu, 2013).

Estirpes VISA foram inicialmente descritas em 1997 no Japão (Gardete & Tomasz, 2014), e desde 2002 diversos casos de resistência têm sido descritos. Estes casos contam com uma fraca disseminação mas conduzem a uma redução da efetividade do antibiótico (Kalenic, 2012).

As estirpes MRSA têm desenvolvido ao longo das décadas, resistências a outros antibióticos utilizados para tratar infeções estafilocócicas como os macrólidos, quinolonas, co-trimoxazol, rifampicina, ácido fusídico, entre outros (Kalenic, 2012), o

que conduz ao isolamento e à existência de, especialmente nesta espécie, diversos clones com diferentes genes de resistência associados.

Tendo em conta a elevada diversidade clonal de estirpes MRSA, a deteção e o diagnóstico em situações clínicas é de extrema importância, principalmente por informar sobre o melhor tratamento individualizado (Paterson et al., 2014).

Tendo em conta esta situação problemática, várias medidas preventivas foram tomadas a nível hospitalar. Todas estas medidas incluem o seguimento de *guidelines* que os hospitais, com menor ou maior sucesso, devem cumprir. As medidas preventivas de maior importância recaem sobre: cuidados específicos a ter com cateteres vasculares centrais, descontaminação do ambiente de trabalho e dos equipamentos utilizados, higienização das mãos, isolamento de pacientes infetados e até colonizados com estirpes resistentes e uma seleção ativa de portadores na admissão no hospital (Kalenic, 2012).

7.2. Clínica

S. aureus pode ser, como já foi referido, um microrganismo comensal. Como tal, pode causar infeção em doentes imunocomprometidos e em hemodiálise (Uhlemann et al., 2014).

Na última década, a incidência de infeções por este microrganismo tem aumentado e atualmente, *S. aureus* é um microrganismo que causa um variado leque de infeções clínicas, sendo frequentemente associado a infeções da pele e dos tecidos moles, dos ossos e das articulações, pneumonia, bacteriemia (Kang, Song, Ko, Chung, & Peck, 2011) e infeções relacionadas com dispositivos médicos (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015), como cateteres e ventiladores. Por possibilitar infeções por meio de ventiladores, encontra-se largamente associado a condições pulmonares severas como PAV (Uhlemann et al., 2014).

A bacteriemia é a manifestação clínica mais bem descrita desta bactéria (Tong et al., 2015), e está frequentemente associada a infeções primariamente resultantes de uma intervenção cirúrgica ou do uso de dispositivos médicos como os cateteres. A endocardite infecciosa por *S. aureus* é a causa mais comum de endocardites nos países desenvolvidos (Tong et al., 2015) e surge como uma manifestação resultante de bacteriémias (Barroso et al., 2014; Uhlemann et al., 2014).

A nível das IPTM pode causar abscessos e celulite purulenta. Osteomielite e artrite séptica (artrite de origem infecciosa) são as manifestações clínicas mais frequentes a nível das infeções da pele e dos tecidos moles (Tong et al., 2015).

Atualmente, as estirpes de *S. aureus* encontram-se bem estabelecidas em meio hospitalar, sendo as estirpes MRSA uma das causas mais comuns de IACS, e na comunidade (Uhlemann et al., 2014).

A nível comunitário, pode ainda causar doença pela produção de toxinas, como é o caso da síndrome do choque tóxico, da síndrome da pele escaldada, do impetigo e das intoxicações alimentares (Barroso et al., 2014). O síndrome do choque tóxico, desenvolve-se em adolescentes e mulheres menstruadas devido ao tempo excessivo de uso de tampões com fibras sintéticas (Uhlemann et al., 2014).

CAPÍTULO II - METODOLOGIA

Pretendeu-se com este trabalho realizar um estado da arte sobre a “Epidemiologia molecular de estirpes bacterianas multiresistentes: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*”. Para tal realizou-se uma revisão bibliográfica de trabalhos científicos publicados, utilizando um método exploratório, crítico e interpretativo desses conteúdos. O carácter exploratório foi utilizado em bases de dados cientificamente validadas como o caso do Pubmed.

Por questões de volume de trabalho, tempo limitado e pertinência, optou-se por analisar os trabalhos publicados durante os últimos seis anos (2010-2016) e realizados na Europa. Os trabalhos anteriores a esta data e realizados fora da Europa foram igualmente tidos em conta, mas exclusivamente nos capítulos introdutórios.

A pesquisa efetuada baseou-se nas características gerais, laboratoriais e clínicas, mas sobretudo nas características epidemiológicas moleculares das três espécies bacterianas acima referidas: designação dos clones associados a resistências e as suas respetivas prevalências, genes de resistência e fatores de virulência. Foi também dada importância à localização europeia dos estudos, o período em que o mesmo decorreu e os métodos utilizados na epidemiologia molecular.

CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

De modo a que fosse possível realizar posteriormente ligações e comparações entre a prevalência epidemiológica dos clones presentes nas estirpes multirresistentes, optou-se por utilizar apenas a nomenclatura clonal proveniente da técnica MLST, nos resultados e na discussão dos mesmos, por ser considerada atualmente a técnica universal e gold-standard na genotipagem (Seidl et al., 2015).

Esta técnica – MLST – permite a comparação de resultados entre laboratórios contribuindo para uma melhor e mais fácil compreensão da epidemiologia molecular a nível mundial, e neste caso europeia, permitindo analisar as relações entre os fenótipos e genótipos de determinada espécie bacteriana. (Da Silva, Mendonça, Batista, & Duarte, 2010)

Em relação à genotipagem de estirpes de *A. baumannii*, existem duas bases de dados para fins comparativos. Optou-se por utilizar a nomenclatura referente à base de dados Pasteur's MLST, por, embora possuir apenas 587 isolados face aos 630 isolados da base de dados PubMLST, ser uma base de dados mais recente. (Zarrilli et al., 2013)

Como pode ser verificado pela análise das tabelas abaixo apresentadas, existe uma maior diversidade de clones e suas respetivas associações a nível dos genes de resistência em estirpes de *S. aureus*, do que em estirpes de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Esta diferença baseia-se sobretudo nas características gerais e intrínsecas de cada bactéria, ou seja, bactérias como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* já possuem um elevado número de resistências intrínsecas o que conduz a uma menor variação nas resistências adquiridas.

1. *Acinetobacter baumannii*

Tabela 1 – Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de *Acinetobacter baumannii* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Designação do Clone	Prevalência	Localização do estudo	Período do estudo	Grupo de Estudo	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Acinetobacter baumannii</i> (CRAB)	ST2 = EC II, ST32	20% ST2; 80% ST32	Hospitais de Fátima	1998-2009	Utilizados 15 isolados dos 3 grupos de suscetibilidade antimicrobiana	<i>AMP-5</i> (3 isolados A); <i>OXA-40</i> (9 isolados B e 3 isolados C)	pAICU20, pAICU32	TSA; método de difusão em agar; Etest; Pasteur's MLST; PubMLST.	(Da Silva, Mendonça, Batista, & Duarte, 2010)
	ST2 - EC II, ST78 - Italian Clone	96% ST2; 4% ST78	Unidade de Cuidados Intensivos Palermo - Itália	Outubro de 2010 - Março de 2011	61 isolados de 36 pacientes	100% <i>blaOXA-51-like</i> ; 80% <i>blaOXA-23</i> (ST2); 3% <i>blaOXA-58</i>	-	multiplex PCR; <i>isp</i> -PCR; Pasteur's MLST; Vitek2; Etest; Agilent 2100 Bioanalyzer; Método Kullback-Leibler	(Mammì et al., 2012)
	ST2 - EC II, ST78 - Italian Clone	1,2% ST78	25 laboratórios - Itália	Mai 2011 - Junho de 2011	246 isolados de 25 laboratórios - Apenas 1 isolado por paciente	2,4% <i>blaOXA-23-like</i> e <i>blaOXA-58-like</i> ; <i>blaOXA-51-like</i> .	-	TSA; Etest; Phoenix; Vitek2; MALDI-TOF; PCR; multiplex PCR; REP-PCR; Pasteur's MLST; UFGMA	(Principe et al., 2014)
	ST2 - EC II, ST115, ST1, ST20, ST125, ST25, ST85, ST107	64% ST2, 3% ST115, 8% ST1 + ST20 + ST125, 6% ST25, 5,5% ST85, 8% ST107	23 laboratórios afiliados a Hospitais e Clínicas - França	Dezembro de 2010 - Agosto 2011	110 isolados de 23 laboratórios - Apenas 1 isolado por paciente	<i>blaOXA-23</i> , <i>blaPER-7</i> , <i>blaOXA-24</i> , <i>blaOXA-58</i> , <i>blaOXA-66</i>	-	TSA; microdilução e método de difusão em agar; Vitek 2; Espectrometria de Massa; multiplex PCR; Pasteur's MLST	(Jeannot et al., 2014)
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC17978	3LST; ST101 - EC II	100% dos isolados	Hospital Universitário de Larissa, Thessaly - Grécia Central	Janeiro 2012 - Dezembro 2014	87 isolados (de um grupo de 1116 isolados de <i>A. baumannii</i> resistentes aos carbapenems)	<i>blaOXA-23</i> ; Mutações nos genes <i>LpxA</i> (Y131H), <i>LpxC</i> (C120R-N287D), <i>LpxD</i> (E117K); Mutações nos genes <i>zmpA</i> e <i>zmpC</i> .	-	Vitek 2; Etest; Broth microdilution; 3LST; Quick-gDNA; PCR	(Oikonomou et al., 2015)

Legenda 1: CRAB – Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*; EC – European clone; MLST – Multilocus Sequence Typing; PCR – Polymerase chain reaction; ST – Sequence type;

Tabela 2 – Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Designação dos Clones	Prevalência	Grupos de estudo	Genes de Resistência	Distribuição dos clones/genes/enzimas	Resistências adquiridas	Técnicas utilizadas	Referência do estudo	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Método de Pasteur: ST1-32, ST34-59, ST77-86, ST94-106, ST109-111, ST117, ST118, ST120, ST123, ST124, ST126, ST127 e ST129-134	Prevalência: 64,7% Método Pasteur: 496 foram identificados como clones de <i>A. baumannii</i> , 18 clones foram descritos como clones internacionais, enquanto que 6 clones apenas estão restritos à Europa	Apenas 1 isolado por país por ST. Adicionalmente isolados do mesmo país com o mesmo ST foram considerados como replicados. 150 isolados genotipados usando a base de dados de Pasteur	Mutações nos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i> ; <i>aphA6</i> , <i>aphA15</i> phosphotransferase, <i>aacC1</i> , <i>aacC2</i> , <i>aacA4</i> , <i>aac(6)-Iad</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , acetiltransferase <i>aac(6)-II</i> , <i>aacB</i> , <i>aacA1</i> , <i>aacA4</i> <i>mecA</i> <i>mecD</i> <i>blaOXA-58-like</i> ; <i>armA</i> , <i>impI</i> , <i>impD</i> , <i>blaGES-14</i> , <i>blaKPC</i> , <i>blaIMP</i> , <i>blaVIM</i> , <i>blaSIM-1</i> , <i>blaNDM</i> , <i>blaOXA-23-like</i> , <i>blaOXA-24-like</i> , <i>blaOXA-51-like</i> , <i>blaOXA-58-like</i> , <i>blaOXA-104</i> , <i>blaOXA-143</i> , <i>blaOXA-164</i> e <i>blaOXA-182</i>	Itália, Espanha, Alemanha, Reino Unido, Grécia, Noruega, Holanda, Dinamarca, República Checa, França, Polónia, Turquia, Suécia, Portugal, Irlanda, Bélgica	Beta-lactâmicos incluindo carbapenemos	PCR; Análise de sequência de <i>blaOXA-51-like</i> ; PFGE; MLVA; MLST; SNPs; Algoritmo MST	(Karah, Sundsfjord, Townner, & Samuelson, 2012)	
	CC2	20% dos isolados		<i>blaVIM-1</i> , <i>blaOXA-23-like</i> , <i>blaOXA-24-like</i> , <i>blaOXA-58-like</i> , <i>blaOXA-51-like</i>	Alemanha, Itália, Noruega, Bulgária, Reino Unido, Polónia, Eslovénia, Croácia, República Checa, Irlanda, Bélgica, Suíça, Espanha, França, Grécia, Holanda, Turquia				
	CC1	12% dos isolados		<i>blaVIM-4</i> , <i>blaOXA-23-like</i> , <i>blaOXA-58-like</i> , <i>blaOXA-51-like</i>	Alemanha, Itália, Noruega, Bulgária, Reino Unido, Polónia, Eslovénia, Croácia, República Checa, Irlanda, Bélgica, Suíça, Espanha, França, Grécia, Holanda, Turquia				
	CC3	2,6% dos isolados		<i>blaOXA-71-like</i> , <i>blaOXA-58-like</i>	França, Alemanha, Espanha, Holanda, Itália e Bélgica				
	CC15	2,6% dos isolados		<i>blaOXA-23-like</i> , <i>blaOXA-58-like</i> , <i>armA</i> , <i>blaOXA-51</i> , <i>blaOXA-132</i>	Noruega, Portugal, República Checa, Holanda, Turquia, Espanha, Grécia	Beta-lactâmicos incluindo carbapenemos e aminoglicosídeos			
	CC32P	1% dos isolados		<i>blaIMP-5</i>	Suécia, Dinamarca, Espanha e Portugal	Beta-lactâmicos incluindo carbapenemos			

Tabela 3 – Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *Acinetobacter baumannii* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Designação dos Clones	Prevalência	Grupos de estudo	Genes de Resistência	Distribuição dos clones/genos/enzimas	Resistências adquiridas	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Pasteur's MLST: CC1, CC2, CC3, ST25, CC15, ST78, CC10, CC32, ST32, CC79	-	-	<i>blaOXA-23</i> , <i>blaOXA-58</i> , <i>blaOXA-27</i> , <i>blaOXA-49</i> , <i>blaOXA-73</i> , <i>blaOXA-24</i> , <i>blaOXA-40</i> , <i>blaOXA-25</i> , <i>blaOXA-26</i> , <i>blaOXA-72</i> , <i>blaIMP-2</i> , <i>blaIMP-4</i> , <i>blaIMP-5</i> , <i>blaIMP-6</i> , <i>blaIMP-8</i> , <i>blaVIM-1</i> , <i>blaVIM-3</i> , <i>blaVIM-4</i> , <i>blaVIM-11</i> , <i>blaNDM-1</i>	<i>OXA-24</i> = <i>OXA-40</i> - Espanha e Portugal; <i>OXA-25</i> - Espanha; <i>OXA-26</i> - Bélgica; <i>OXA-72</i> - Croácia e Itália; <i>NDM-1</i> - Alemanha, Bélgica e República Checa. <i>VIM-1</i> , <i>VIM-3</i> , <i>VIM-4</i> e <i>VIM-11</i> , <i>GES-14</i> - França	Resistência a Beta-lactâmicos incluindo carbapenemos	AFLP; PFGE; MLVA, Genotipagem de <i>single locus</i> ; 3LS; PubMLST, Pasteur's MLST; PCR/ESI-MS, tipagem de plasmídeos e tipagem de ilhas de resistência; NG WGS	(Zarrili, Pourmaras, Giannouli, & Tsakris, 2013)

1.1. Resistências descritas

Como referido anteriormente, *A. baumannii* apresenta de forma intrínseca resistência a uma variedade de agentes terapêuticos; ampicilina, amoxicilina e ácido clavulânico, cefazolina, cefotaxima, ceftriaxona, trimetropim e fosfomicina são disso exemplos (Karah et al., 2012).

Os antibióticos de escolha para o tratamento de infeções causadas por este microrganismo incluem os aminoglicosídeos, as fluoroquinolonas (Karah et al., 2012) e os carbapenemos (Kempf & Rolain, 2012). Para o tratamento de infeções por MMR de *A. baumannii*, os carbapenemos foram considerados os antibióticos apropriados (Qureshi et al., 2015).

Apesar dos efeitos adversos associados e da sua incapacidade de tratar todos os tipos de infeções, a colistina também tem sido considerada uma opção terapêutica para o tratamento de infeções por esta bactéria devido à emergência e à elevada prevalência de estirpes multirresistentes (Kempf & Rolain, 2012), estando descrito como o antibiótico mais efetivo e de última linha (Antunes et al., 2014). Este antibiótico foi descoberto em 1949, utilizado nos anos 50 e abandonado nos anos 80 devido à elevada incidência de nefrotoxicidade. Nas últimas duas décadas, tem sido utilizado em pacientes com fibrose quística, que apresentem infeções por bactérias de Gram-negativo, sob a forma de aerossol ou por via intravenosa (Kempf & Rolain, 2012).

A resistência aos aminoglicosídeos é especialmente mediada pela produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – EMGs. Genes como *aphA1*, *aphA6*, *aphA15 fosfotransferase*, *aacC1*, *aacC2*, *aacA4*, *aac (6') -Iad*, têm sido descritos como codificadores para tais enzimas; associações concomitantes destes genes têm também sido reportadas (Karah et al., 2012).

Estirpes de *A. baumannii*, com genes que codifiquem para a presença de uma enzima mediadora de uma elevada resistência aos aminoglicosídeos. – *16S rRNA metilase ArmA* –, têm sido igualmente identificadas. De modo sucinto, esta enzima protege indiretamente os locais alvo dos antimicrobianos através da metilação pós - transcricional dos mesmos, levando posteriormente a uma menor afinidade do 16S rRNA aos glicosídeos (Karah et al., 2012).

Por outro lado, as resistências adquiridas por este microrganismo às quinolonas devem-se sobretudo a mutações cromossômicas na região determinante dos genes *gyrA* e *parC*, e na subsequente produção de enzimas DNA gyra e DNA topoisomerase IV de forma modificada. É ainda descrito que, para obter uma elevada taxa de resistência a este antibiótico, deve existir, nesta região, uma dupla mutação (Karah et al., 2012).

A resistência aos carbapenemos, é um fenómeno relativamente recente, apesar da resistência a este antibiótico ter sido reportada no início dos anos 90 (Kempf & Rolain, 2012).

Tendo em conta a atual emergência de diversas resistências associadas aos carbapenemos em *A. baumannii*, e conseqüente preocupação pela expansão destes clones, propusemo-nos a pesquisar e analisar dados europeus dos últimos seis anos, referentes a esta problemática.

Esta temática é de enorme importância, uma vez que infeções por estirpes multiresistentes de *A. baumannii* levam a tratamentos a longo prazo, com procedimentos de diagnóstico, terapêutica e controlo da infeção de elevados custos económicos (Mamma et al., 2012), mas também a uma necessidade de utilizar tratamentos de última linha, muitas vezes associados a efeitos adversos vastos.

O mais emergente mecanismo de resistência aos carbapenemos, nos microrganismos de Gram-negativo, recai sobre a produção de MBLs – metalo – β – lactamases. Dentro deste grupo, as enzimas mais prevalentes e às quais se encontra associada uma maior ameaça clínica são as enzimas pertencentes à família VIM e IMP (Grosso et al., 2015).

1.2. Resistência aos carbapenemos

Por norma, todos os isolados de *A. baumannii* possuem intrinsecamente uma *bla*_{OXA-51} β -lactamase – uma carbapenemase de baixa atividade. Além disso, numa vasta proporção de isolados de diferentes áreas geográficas, a resistência aos carbapenemos é mediada pela aquisição de enzimas de classe B ou classe D hidrolisantes dos carbapenemos (Mamma et al., 2012). Da classe D de carbapenemases destacam-se a OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143, OXA-235 e a enzima intrínseca OXA-51, já referida anteriormente (Principe et al., 2014). Segundo a literatura, o gene *bla*_{OXA-58} tem

sido o gene, pertencente à classe D de carbapenemases, mais prevalente em Itália (Mamma et al., 2012).

Em Portugal, um estudo com o objetivo de identificar STs associados à resistência a carbapenemos foi realizado durante 1998-2009, Tabela 1. É de denotar o largo período de estudo, tendo em conta que por norma, os períodos de estudo são de relativamente poucos anos. Durante esta observação foram recolhidos em Portugal cerca de 540 isolados de *A. baumannii*, que, após a realização de TSA, foram divididos em três grupos: grupo A – resistente aos β -lactâmicos, mas suscetível a aminoglicosídeos e quinolonas -, grupo B – resistente a todos os antibióticos exceto tobramicina, ampicacina e colistina -, e grupo C – resistente a todos os β -lactâmicos, mas suscetível à gentamicina, netilmicina, tobramicina, ampicacina e colistina. Para efeitos de genotipagem molecular, apenas foram utilizados 15 isolados de cada grupo de suscetibilidade antimicrobiana (Da Silva et al., 2010).

Utilizando a base de dados Pasteur's MLST, os isolados foram identificados em ST2 e ST32, com respetivamente 20% e 80% de prevalência face a todos os isolados analisados. É de denotar, que o clone ST2, pertencente ao CC2, é igualmente conhecido como *European Clone II* ou como *International Clone II*. Esta designação surgiu da caracterização genotípica de linhagens clonais distintas de *A. baumannii* multirresistentes que se encontram largamente disseminadas a nível europeu (Mamma et al., 2012) e a nível mundial.

Em artigos de revisão, possíveis de consultar na Tabela 2., foram reportadas mais uma vez associações entre o CC2 e o IC-II, concluindo que ambos se encontram intimamente relacionados (Karah et al., 2012; Zarrilli et al., 2013).

De acordo com o estudo, os genes de resistência identificados em Portugal foram apenas dois, divididos consoante os grupos de suscetibilidade antimicrobiana. No grupo A, três isolados demonstraram a presença do gene IMP-5 MBL, e no grupo B e C, nove e três isolados respetivamente, demonstraram a presença do gene *bla_{OXA-40}*. Neste estudo, ao contrário do que acontece nos restantes analisados neste trabalho, foram também pesquisados fatores de virulência, sendo identificados o fator pA_{ICU20} e o fator pA_{ICU32}, que contribuem para a virulência do clone ST2 (Da Silva et al., 2010).

É de elevada importância referir que os três isolados que apresentaram o gene IMP-5, foram recolhidos apenas de um hospital e não foram identificados nos anos posteriores ao seu isolamento, sendo associados ao clone ST32 (Da Silva et al., 2010).

Num estudo mais recente, realizado em Palermo, Itália, com o objetivo de analisar a disseminação e a prevalência clonal de CRAB nas UCI desta cidade, revelou que a prevalência do clone ST2 foi de cerca de 96%, em 61 bactérias resistentes aos carbapenemos isolados de 36 pacientes, tendo sido o trato respiratório o local mais comum de infeção. Associado a este clone, foi identificada a presença do gene *bla_{OXA-23}*, responsável pela resistência aos carbapenemos (Mamina et al., 2012).

O clone ST78, conhecido como *Italian Clone*, foi isolado pela primeira vez em Nápoles, no ano de 2006, e apresenta uma larga disseminação em Itália (Principe et al., 2014). Foi identificado nas UCI em Palermo, com uma prevalência de 4%; e identificado de igual forma por 23 laboratórios italianos com uma percentagem de 1.2% em 246 CRAB.

Apesar do primeiro estudo se ter realizado entre outubro de 2010 a março de 2011 e o segundo estudo de maio 2011 a junho 2011, e de se verificar uma diferença bastante significativa na prevalência do clone ST78 – 4% para 61 isolados e 1.2% para 246 isolados – não foi possível concluir sobre a diminuição da disseminação do mesmo, pela insuficiência de dados comparativos em ambos os estudos (Mamina et al., 2012; Principe et al., 2014).

A grande maioria dos isolados bacterianos analisados nos 23 laboratórios italianos era resistente aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenemos (Principe et al., 2014), retratando o conceito de multirresistência aos antibióticos. Associadas a estas resistências foram identificadas as enzimas OXA-23 e OXA-58, sendo que seis isolados obtidos de pacientes hospitalizados partilhavam ambas as enzimas, mostrando um perfil de resistência aos antibióticos bastante mais elevado.

Como já foi referido, o gene *bla_{OXA-58}* tem sido o gene, pertencente à classe D de carbapenemases, mais prevalente em Itália. Contudo, e de acordo com dados atuais, tem-se verificado uma gradual substituição pelo gene *bla_{OXA-23}* (Mamina et al., 2012), mais predominante em França (Jeannot et al., 2014). Esta substituição encontra-se associada a um aumento dos valores de CMI dos antibióticos necessários para o tratamento de

infecções com microrganismos com este gene de resistência, o que acaba por constituir uma vantagem seletiva para as bactérias que o possuam. Este facto permite afirmar que a resistência conferida por este gene é a chave para o sucesso de estirpes epidémicas que o transportam (Mamma et al., 2012).

O clone ST2, foi ainda previamente identificado em França, entre dezembro de 2010 e agosto de 2011, com uma prevalência de 64% em 110 CRAB. Pela técnica de MLST, foram também identificados os clones ST115, ST1, ST20, ST125, ST25, ST85 e ST107, com prevalências de respetivamente 3%, 8% - ST1 + ST20 + ST125 – 6%, 5.5% e 8% (Jeannot et al., 2014).

Tal como acontece com o clone ST2 que pertence ao CC2, também o ST1 e o ST3 pertencem ao CC1 e CC3, respetivamente. Através da literatura, é possível afirmar que o CC1 se encontra intimamente relacionado com o IC-I, e que o CC3 se encontra intimamente relacionado com o IC-III; (Karah et al., 2012; Zarrilli et al., 2013). Relativamente ao CC1, os isolados bacterianos deste complexo possuíam as ilhas genómicas resistentes AbaR1, AbaR3, AbaR21 e AbaR3-like (Karah et al., 2012). O termo ilhas genómicas resistentes descreve longas sequências de DNA que foram adquiridas de outros microrganismos por elementos genéticos móveis e que transportam regiões de resistência antibiótica inseridas no gene ATPase (*comM*) (Lee, D'Souza, Yong, & Lee, 2016).

Em 2013, foram ainda descritas associações entre determinados genes e os IC. O gene *VIM-1* por exemplo, foi descrito como estando associado ao IC-II; o gene *VIM-4* ao IC-I; e por sua vez o gene *NDM-1* foi associado ao IC-I e IC-III (Zarrilli et al., 2013).

Associados aos clones identificados em França foram descritos o gene de resistência *bla_{OXA-23}*, *bla_{PER-7}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}* e *bla_{OXA-66}*. É de denotar que os isolados analisados que eram portadores de genes de resistência para os carbapenemos foram essencialmente recolhidos de amostras do trato respiratório.

Alguns artigos utilizados nesta monografia para analisar a epidemiologia molecular de isolados resistentes de *A. baumannii* e a sua prevalência na Europa, são artigos que não referem a ST do clone associado a uma determinada estirpe bacteriana multirresistente, identificando apenas o seu complexo clonal. Um artigo de revisão datado de 2012 (Karah et al., 2012) constitui um perfeito exemplo para esta situação; este artigo compilou vários estudos em países europeus, onde foi possível identificar o CC2, o CC1,

o CC3, o CC15 e o CC32P, apresentando os CCs prevalências decrescentes, ou seja, o CC2 apresentava 20% de prevalência face a todos os isolados e o CC32P apresentava 1%.

Da análise da Tabela 2, é possível verificar que estes complexos foram isolados em diversos países europeus, com clones comuns entre todos, sendo que Espanha foi o único país em que foram identificados todos os complexos clonais. CC2, CC15 e CC32P foram os complexos clonais identificados em Portugal (Karah et al., 2012).

A presença dos genes de resistência *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-132}, *armA* e *bla*_{IMP-5}, foram associados ao CC15 e ao CC32P. Curiosamente, o gene *bla*_{OXA-132} e o gene *bla*_{OXA-51} diferem em apenas um nucleótido (Karah et al., 2012)

O gene *bla*_{OXA-24} e o gene *bla*_{OXA-40} foram ambos identificados em Espanha e em Portugal, enquanto os genes *bla*_{OXA-25} e *bla*_{OXA-72}, que apresentam estruturas genéticas similares (Zarrilli et al., 2013), foram identificados respetivamente em Espanha e Itália, e na Croácia.

O clone *EC – II* foi identificado num estudo bastante recente, realizado entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014 (Oikonomou et al., 2015). Este clone foi identificado utilizando uma técnica de genotipagem molecular que não o MLST – mas sim 3LST. Apesar da técnica de genotipagem ser diferente da utilizada para analisar os restantes resultados, este estudo é de enorme relevância sendo importante referi-lo por três razões distintas: em primeiro lugar, pelo recente período de estudo e pelo facto de os resultados serem analisados anualmente; em segundo lugar, pelo facto de existir uma prevalência de 100% deste clone nos 87 isolados caracterizados a nível molecular; e em terceiro lugar, pelo facto de ser um estudo em que são descritas resistências à colistina.

1.3. Resistência à colistina

O interesse clínico pela colistina tem aumentado nos últimos dez anos, devido à falta de novas moléculas e devido à emergência de isolados bacterianos de Gram-negativo resistentes às restantes opções terapêuticas (Potron et al., 2015).

A resistência à colistina, considerada antibiótica de última linha contra infeções multiresistentes por *A. baumannii*, principalmente infeções por CRAB (Qureshi et al., 2015); (Kempf & Rolain, 2012) é um fenómeno relativamente recente. Na maioria dos

casos, a resistência a este antibiótico encontra-se associada a uma exposição prévia (Qureshi et al., 2015) e a um aumento do uso da colistina (Potron et al., 2015).

Em *A. baumannii* a resistência à colistina pode ser consequência de dois mecanismos: mutações no sistema PmrAB que conduzem a alterações a nível do componente lipídico A no lipopolissacarídeo (LPS), ou mutações nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* que conduzem a perda total da biossíntese do LPS (Potron et al., 2015).

No estudo entre janeiro de 2012 e dezembro de 2014 (Oikonomou et al., 2015) reportaram que em 2012 a resistência aos carbapenemos foi de 93%, relativamente aos 88% em 2013 e aos 91% em 2014. A resistência à colistina, foi de 1% em 2012, 2.9% em 2013 e 21.1% em 2014. A análise destes valores permite claramente verificar um aumento significativo da resistência à colistina, o que sugere uma emergência de genes de resistência. De um modo geral, nos primeiros quatro meses de 2015, a taxa de resistência à colistina/carbapenemos continuou a aumentar alcançando uma percentagem de 52% (Oikonomou et al., 2015).

Com a emergência de resistências à colistina surgem as estirpes bacterianas resistentes a todas as classes antimicrobianas (Antunes et al., 2014).

2. *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 4 –Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Designação do Clone	Prevalência	Localização do estudo	Período do estudo	Grupo de Estudo	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (XDRPa)	ST235	-	Hospital Português	Junho de 2012	1 isolado, de <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenemos	<i>blaGES-6</i> ; <i>aacA7</i>	-	TSA: diluição em agar; métodos ETEST; PCR; I-Ceul-PFGE; MLST	(Botelho, Grosso, Sousa, & Peixe, 2015)
	ST308	100%	Hospital Universitário de Turbingen, Alemanha	Julho de 2009 - Março de 2012	41 isolados de 26 pacientes - Isolados exibindo um fenótipo XDR e que possuísem o gene <i>blaIMP-8</i> . (Múltiplos isolados do mesmo paciente foram incluídos desde que tivessem sido obtidos em dias diferentes ou de diferentes fontes)	<i>IMP-8</i>	-	TSA: método do gradiente de difusão; outros Etests; Algoritmo progressivo de <i>MauyG</i> ; Algoritmo TPS; MLST	(Willmann et al., 2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDRPa)	ST175 - Clone B; ST235 - Clone A; Clone C e Clone D	96% <i>P. aeruginosa</i> 58% ST175; 16% ST235	Hospital Universitário 12 de Outubro em Madrid, Espanha	Janeiro 2007- Dezembro 2010	Todos os pacientes que tenham sido colonizados ou infetados com <i>P. aeruginosa</i> e que não tivessem fibrose quística.	<i>blaVIM-2</i> ; <i>blaIMP-22</i> ; <i>blaVIM-1</i>	-	TSA; PFGE; MLST; Análise de integreões; Caracterização dos MBLs adquiridos; Análises estatísticas	(Viedma et al., 2012)
	ST235, ST111, ST253, ST309 e ST639	-	Hospital Universitário de Patras, Grécia	2 Anos	240 isolados não replicados	<i>blaVIM-1</i> ; <i>blaVIM-2</i>	Genes TTSS - <i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoU</i> , <i>exoY</i>	TSA Etest, ELISA, PCR, PFGE, MLST	(Koutsogiannou et al., 2013)
	ST235, ST111, ST229, ST175, ST308, ST560.	50% MDRPA CC235; 14,5% ST235; 1,6% ST111; 1,6% ST229; 1,6% ST175; 0,8% ST308; 0,8% ST560.	França	Janeiro 2010 - Dezembro 2010 (30); 2011 - (17)	124 isolados em diferentes hospitais europeus	<i>blaIMP-1</i> ; <i>blaVIM-2</i> ; <i>blaGES1</i> , gene <i>OprD</i> e <i>AmpC</i>	-	TSA; MLVA; MLST; Análise de restrição de fragmentos	(Larché et al., 2012)

Tabela 5 – Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de *Pseudomonas aeruginosa* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Designação do Clone	Prevalência	Localização do estudo	Período do estudo	Grupo de Estudo	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ST111, ST606	0,3% ST111; 0,6% ST606	Instituições de Saúde nas Ilhas Canárias em Espanha	2009-2011	298 isolados não suscetíveis aos carbapenemos	<i>blaIMP-15</i> ; <i>blaVIM-2</i> ; <i>blaVIM-1</i>	-	TSA; MBL-Etest (bioMérieux); PCR; PFGE; MLST	(Gilaranz et al., 2013)
	ST235, ST534, ST111, ST175, ST17, ST446, ST931, ST10, ST316, ST1400	8,7% CC235 (ST235 + ST534); 0,9% ST111; 0,19% ST175.	27 Hospitais - 14 Países Europeus	2009-2011	529 isolados	<i>blaVIM-2</i> ; <i>blaVIM-4</i> ; <i>blaVIM-1</i> ; <i>blaVIM-5</i> ; <i>blaIMP-15</i> ; <i>blaIMP-33</i> ; <i>blaVIM-36 e</i> <i>blaVIM-37</i>	-	TSA; PFGE, SpeI , CHEF-DR III apparatus; MLST; PCR Deteção fenotípica da expressão de bombas de efluxo e da atividade de carbapenemases; Western Blot	(Castanheira, Deshpande, Costello, Davies, & Jones, 2014)
	ST111, ST233, ST235, ST357, ST654, ST904 e ST773	-	Laboratório de referência nacional no Reino Unido	2003-2012	267 isolados não replicados referenciados a 89 laboratórios (posteriormente referenciados ao laboratório nacional)	<i>blaVIM-2</i> ; <i>blaVIM-1</i> ; <i>blaVIM-4</i> ; <i>blaVIM-6</i> ; <i>blaIMP-1</i> ; <i>blaIMP-7</i> ; <i>blaIMP-10</i> ; <i>blaIMP-13</i> ; <i>blaNDM-1</i>	-	PCR, Multiplex PCR, PFGE, Análise VNTR; MLST	(Wright, Turton, Livermore, Hopkins, & Woodford, 2015)
	ST235	-	University Bochum em Ruhr na Alemanha	2010	1 isolado de <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenemos recuperado de um exsudado inguinal.	<i>blaIMP-31</i> ; <i>blaOXA-55</i> ; <i>aphA15</i> ; blaC ; blaA gene <i>OprD</i>	-	TSA; Etest, Etest MBL imipenem, EDTA-CDT, EDTA bioassay; PCR; Clonagem do gene <i>blaIMP-31</i> ; Purificação de <i>IMP-31</i> e <i>IMP-1</i>	(Pfenningwerth, Geis, Gatermann, & Kaase, 2014)

Tabela 6 –Continuação do resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Designação dos Clones	Localização do estudo e Prevalência	Localização dos estudos	Períodos dos estudos	Grupos de estudo	Genes de resistência	Mecanismos de resistência	Fatores de Virulência	Resistências adquiridas (Fármacos)	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDRPa)	PA14, ST235, ST111, ST175, ST146	Espanha - 90% isolados XDR: ST111, ST175 e ST235	Hospitais em Espanha; França	-	-	<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i> , <i>pmrAB</i> , <i>phoPQ</i> , <i>coiRS</i> , <i>csrKS</i> , <i>parRS</i> , <i>mexR</i> , <i>nalC</i> , <i>nalD</i> , <i>uidB</i> , <i>mexT</i> , <i>mexS</i> , <i>mvaA</i> , <i>mexZ</i> , PA5471, <i>ampD</i> , <i>dacB</i> , <i>ampR</i> , <i>OprD</i> , <i>nal</i>	Sobreexpressão de MexXY; sobreexpressão de MexAB - OprM; MexCD - OprJ; MexEF - OprN; sobreexpressão de AmpC; mudanças estruturais no AmpC; fraca regulação da porina OprD; inativação da OprD	Genes TTSS: <i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoU</i> ou <i>exoY</i>	<u>Piperacilina-Tazobactam</u> , <u>Ceftazidima</u> , <u>Cefepime</u> , <u>Imipenem</u> , <u>Meropenem</u> , <u>Ciprofloxacina</u> , <u>Tobramicina</u> e <u>Colistina</u>	-	(Oliver, Mulet, López-Causapé, & Juan, 2015)

Tabela 7 – Resumo das β – lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST235 e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).

B-lactamases adquiridas de forma horizontal em ST235	Type	Enzima	País
Classe A	BEL	BEL-1	Bélgica
		GES-1	França e Espanha
	GES	GES-5	Espanha
		GES-6	Portugal
	PER	PER-1	Turquia, Polónia, Hungria, Grécia, Bélgica, França, Croácia e Roménia.
	PSE	PSE-1	Grécia, Itália.
	FIM	FIM-1	Itália
	IMP	IMP-29	França
	IMP	IMP-31	Alemanha
	NDM	NDM-1	Itália
NDM	VIM-1	Croácia, Grécia e Alemanha.	
Classe B	VIM	VIM-2	Croácia, Grécia, Bélgica, Turquia e Espanha.
		VIM-4	Hungria, Noruega, Grécia e Bélgica.
	VIM-13	Espanha	
	OXA-2	Turquia, Polónia, Hungria, Espanha, Itália e Croácia.	
	OXA-10	Grécia	
	OXA-11	Roménia	
	OXA-17	Turquia e Polónia.	
	OXA-19	Grécia.	
	OXA-28	França.	
	OXA-35	Grécia.	
Classe D	OXA-50	Turquia e Polónia.	
	OXA-74	Polónia.	

Tabela 8 – Resumo das β – lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST111 e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).

B-lactamases adquiridas de forma horizontal em ST111	Type	Enzima	País
Classe A	GES	GES-7	Croácia
	PSE	PSE-1	Espanha, Portugal, Croácia e França
	VEB	VEB-1	Bulgária
Classe B	IMP	IMP-7	República Checa
		IMP-13	França
		VIM-1	Espanha e Grécia
	VTM	VIM-2	Holanda, Espanha, Suécia, Noruega, República Checa, Bélgica, Grécia, Itália, Portugal, Croácia, Dinamarca.
		VIM-4	Hungria e Grécia
Classe D	OXA	OXA-2	República Checa
		OXA-9	França
		OXA-46	Espanha
		OXA-101	Espanha

Tabela 9 – Resumo das β – lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST175, ST244 e ST357, e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).

B-lactamases adquiridas de forma horizontal em	Type	Enzima	País
ST175	IMP	IMP-1	Espanha e Alemanha
Classe B			
B-lactamases adquiridas de forma horizontal em	Type	Enzima	País
ST244	PER	PER-1	Polónia
Classe A	VEB	VEB-1	Bulgária e Dinamarca
		OXA-2	Polónia
Classe D	OXA	OXA-10	Dinamarca
		OXA-50	Polónia
B-lactamases adquiridas de forma horizontal em	Type	Enzima	País
ST357	IMP	IMP-7	Polónia e República Checa
Classe B	VIM	VIM-2	República Checa
Classe D	OXA	OXA-2	República Checa

Tabela 10 – Resumo das β – lactamases adquiridas de forma horizontal no clone ST233, ST274 e ST308, e respetivo país de isolamento (Oliver et al., 2015).

B-lactamases adquiridas de forma horizontal em	Type	Enzima	País
ST233 Classe B	VIM	VIM-2	Alemanha, Roménia, França, Noruega, Dinamarca.
B-lactamases adquiridas de forma horizontal em	Type	Enzima	País
ST274 Classe A	VEB	VEB-like	Espanha
B-lactamases adquiridas de forma horizontal em	Type	Enzima	País
ST308 Classe B	IMP	IMP-8	Alemanha
		IMP-13	França

2.1 Resistências descritas

Tal como acontece com *Acinetobacter baumannii*, também a espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresenta genes de resistência intrínsecos que lhe conferem menor suscetibilidade a determinadas classes de antibióticos, ou total perda de suscetibilidade face a determinado antibiótico (Castanheira, Deshpande, Costello, Davies, & Jones, 2014).

Apresenta deste modo, um elevado nível de resistência intrínseca, e uma extraordinária capacidade de se tornar ainda mais resistente.

De modo sucinto, esta bactéria apresenta resistência face a um determinado antibiótico principalmente devido, a pelo menos uma das três seguintes situações: 1) sobreexpressão de sistemas de bombas de efluxo, 2) indução da expressão da enzima AmpC, e 3) diminuição ou até total inativação da porina OprD (Oliver et al., 2015; Viedma et al., 2012). Os três mecanismos mencionados são provavelmente os mecanismos com maior impacto na suscetibilidade antibiótica (Wright, Turton, Livermore, Hopkins, & Woodford, 2015) deste microrganismo comparativamente com os restantes Gram – negativos (Oliver et al., 2015).

Para além de *P. aeruginosa*, as enzimas indutoras AmpC podem ser expressas com níveis elevados em outros microrganismos como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Jacoby, 2009)

Dependendo da situação e do gene envolvido, as bombas de efluxo podem constituir um mecanismo de resistência que contribua consideravelmente para a resistência a determinado antibiótico. Em *P. aeruginosa*, existem 12 sistemas de efluxo diferentes, designados *RND-type systems*. Estudos anteriores revelaram que o sistema *MexAB – OprM* é o sistema com maior relevância na resistência intrínseca a antibióticos (Olivares et al., 2013), especialmente a fluoroquinolonas e a todos os β -lactâmicos, com exceção do imipenem. O sistema *MexXY* é considerado o mais relevante face à suscetibilidade a aminoglicosídeos (Oliver et al., 2015).

Por sua vez, o sistema *MexCD – OprJ*, que é o sistema de efluxo mais associado a isolados bacterianos de amostras de infeções crónicas, confere, quando existe uma sobreexpressão do mesmo, uma menor suscetibilidade à grande maioria dos β – lactâmicos

e aos aminoglicosídeos, além de conferir um aumento na resistência à cefepima (Oliver et al., 2015).

A resistência deste microrganismo às fluoroquinolonas, pode resultar frequentemente de mutações alvo em topoisomerasas, como topoisomerase IV ou DNA girase. Tanto este mecanismo, como o mecanismo de sobreexpressão de bombas de efluxo, conduz a uma percentagem de resistência a este antibiótico de cerca de 30 a 40% em diversos países (Oliver et al., 2015).

A resistência às aminopenicilinas, à maioria das cefalosporinas e ao imipenem é mediada pela indução da expressão da β -lactamase AmpC (Oliver et al., 2015).

Uma sobreexpressão de AmpC pode ser devida à seleção de mutações em genes como *ampD*, *dacB* e *ampR*; esta seleção de mutações é um dos principais mecanismos de resistência adquirida que ocorre em cerca de 20% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Oliver et al., 2015).

Tal como acontece com *A. baumannii*, também em *P. aeruginosa*, existe uma atual preocupação com as estirpes resistentes aos carbapenemos.

Este microrganismo pode adquirir resistência aos carbapenemos pela aquisição de carbapenemases, maioritariamente metalo- β -lactamases de classe B (M β LS); no entanto, são os mecanismos de resistência intrínseca, mais comumente observados, que têm conduzido a uma limitação do uso de carbapenemos na terapêutica antibiótica em determinadas áreas geográficas (Castanheira et al., 2014).

P. aeruginosa resistentes aos carbapenemos (CRPA) possuem frequentemente uma combinação de dois ou mais dos mecanismos de resistência principais acima descritos (Castanheira et al., 2014). De fato, a conjugação da indução da expressão de AmpC com a inativação mutacional da porina OprD, conduz a uma redução na suscetibilidade ao meropenem e numa resistência total ao imipenem. A inativação desta porina, associada a uma sobreexpressão de AmpC, pode conferir a uma bactéria resistência a todos os β -lactâmicos. (Oliver et al., 2015) É possível concluir que mecanismos combinados e/ou mecanismos individuais afetam de forma diferente as moléculas de carbapenemos (Castanheira et al., 2014). Por outro lado, a conjugação da inativação da porina OprD com a hiper-expressão do sistema *MexAB – OprM* é uma das causas com maior relevância clínica na resistência ao meropenem (Oliver et al., 2015).

2.2. Resistência aos carbapenemos

Um estudo realizado durante um período de três anos – 2009 a 2011 –, que pode ser consultado na Tabela 5 desta monografia, teve como objetivo determinar a expressão de bombas de efluxo, de AmpC, e de alterações de proteínas membranares de um determinado grupo de isolados através de PCR em tempo real (Castanheira et al., 2014).

Dos 529 isolados analisados, recolhidos de isolados clínicos de *P. aeruginosa* em 27 hospitais de 14 países europeus, 8.7% foram identificados como ST235 ou ST534, 0.9% como ST111 e 0.19% como ST175. Apesar de não terem sido avaliadas as suas prevalências, clones como ST17, ST446, ST931, ST10, ST316, ST1400 foram também identificados.

De facto, os clones em que a prevalência foi avaliada são, segundo a literatura, os clones considerados de alto risco associados a infeções nosocomiais por isolados MDR ou XDR. Estes clones são frequentemente clones fundadores de grupos ou de complexos clonais (Oliver et al., 2015), cuja expansão é favorecida pela própria resistência aos antibióticos (Larché et al., 2012).

O clone ST235 por exemplo, considerado o clone mais prevalente neste estudo, é o clone fundador do segundo maior complexo clonal – Grupo 2 – contendo além de si 42 STs. O clone ST111 é apenas fundador de um subgrupo, tendo em conta que pertence ao grupo mais amplo existente – Grupo 1. Por sua vez, o clone ST175, é também um clone fundador de um complexo clonal, só que de menores dimensões, denominado Grupo 16 (Oliver et al., 2015).

Associados a estes clones foram identificados os genes *bla_{VIM-2}*, *bla_{VIM-4}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{VIM-5}*, *bla_{IMP-15}*, *bla_{IMP-33}*, *bla_{VIM-36}* e *bla_{VIM-37}*, que codificam para carbapenemases. De um modo geral, a prevalência destes genes aumentou consideravelmente no ano de 2011, com 21.9% de isolados produtores de VIM-2, face aos valores de 9.7% e 8.2% nos anos de 2009 e 2010, respetivamente. O gene *bla_{VIM-1}* foi identificado em isolados provenientes da Alemanha e da Itália, enquanto os genes *bla_{VIM-5}* e *bla_{IMP-15}* foram identificados em isolados provenientes da Alemanha e da Turquia (Castanheira et al., 2014).

Os genes *bla_{IMP-33}*, *bla_{VIM-36}* e *bla_{VIM-37}* são considerados novos genes que codificam para a resistência aos carbapenemos. O gene *bla_{IMP-33}* foi detetado em isolados provenientes de Itália, e apresenta uma diferença ao nível de cinco aminoácidos quando

comparado com o seu homólogo *bla_{IMP-13}*. O gene *bla_{VIM-36}* foi detetado na Bélgica e quando comparado com o gene *bla_{VIM-2}* apresenta apenas um aminoácido diferente. Por último, o gene *bla_{VIM-37}*, com apenas uma diferença de dois aminoácidos, apresenta uma percentagem de semelhança com o gene *bla_{VIM-1}* de cerca de 99.2%. (Castanheira et al., 2014) Estes dados permitem concluir sobre a elevada diversidade genética existente para resistências aos carbapenemos.

Dos 529 isolados, apenas 239 foram avaliados para a presença de genes que codificassem para *AmpC*, *MexAB - OprM* e *MexEF - OprN* tendo em conta que todos estes tinham sido previamente associados à resistência ao doripenem. Posteriormente, 56 isolados foram também avaliados quando à presença de genes para *MexCD – OprJ* e *MexXY – OprM* (Castanheira et al., 2014).

Os resultados obtidos identificaram uma sobreexpressão de *AmpC*, de *MexAB – OprM* (95.4%), de *MexEF – OprN* (89.5%) e de *MexCD – OprJ* (37.5%) (Castanheira et al., 2014), o que indica uma elevada diversidade e prevalência nos mecanismos que conferem resistência aos 239 isolados.

Da análise das tabelas fornecidas, é possível observar a prevalência do clone ST235. A sua identificação foi feita em estudos de um ano, de dois anos e em estudos que decorreram desde 2003 a 2012, o que permite detetar a sua disseminação ao longo do tempo.

Ao analisar-se o estudo realizado em 267 isolados de 89 laboratórios do Reino Unido, durante nove anos, verificou-se que os isolados identificados estavam interligados à presença das respetivas enzimas de resistência. Deste modo, no clone ST235 foram detetadas VIM e IMP, tal como no clone ST111; no clone ST233, ST357 e ST773 foram detetadas apenas enzimas da família VIM; por fim, nos clones ST654 e ST964 foram detetadas enzimas da família VIM, IMP e NDM (Wright et al., 2015).

Por ser um clone de alto risco e com elevada prevalência a nível europeu, um estudo realizado na Universidade de Bochum, na Alemanha, analisou apenas um isolado de *P. aeruginosa* resistente a carbapenemos, mas suscetível à colistina, pertencente ao clone ST235. O objetivo desta análise consistia em caracterizar um novo tipo de enzima IMP encontrado no isolado descrito (Pfennigwerth, Geis, Gatermann, & Kaase, 2014).

A nova enzima IMP-31 apresentava semelhanças de cerca de 96.7% com a enzima IMP-35, e conferia uma elevada resistência a todos os β – lactâmicos, com a exceção do aztreonam. (Pfennigwerth et al., 2014) Além do gene *bla_{IMP-31}*, foram igualmente identificados outros genes de resistência que podem ser consultados na Tabela 5.

Ao contrário do que foi encontrado no estudo europeu efetuado entre 2009-2011, um estudo decorrido entre o período de janeiro de 2007 e dezembro de 2010 em Espanha, revelou uma maior prevalência do clone ST175, designado por clone B, face ao clone ST235, designado por clone A, com percentagens de respetivamente 58% e 16%. É ainda referido que a prevalência de isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos aumentou nos últimos 5 anos (Viedma et al., 2012).

Além dos genes *bla_{VIM-2}* e *bla_{VIM-1}*, também o gene *bla_{IMP-22}* foi associado a estirpes resistentes deste microrganismo. Dos 2.145 pacientes colonizados ou infetados com *Pseudomonas* spp., 96% foram por *P. aeruginosa*. Destes 96%, 8.5% eram isolados MDR ou XDR, e destes 8.5%, 15.3% foram identificados no ano de 2010 (Viedma et al., 2012).

Comparativamente a outros clones, o clone ST175 não apresenta diferenças significativas. Contudo, é descrito em pacientes com mais idade e com alguma prevalência mais elevada em doenças respiratórias crónicas como a DPOC (Viedma et al., 2012). Encontra-se associado ao serotipo O4 e está amplamente distribuído por múltiplos países europeus, como Espanha e Alemanha, onde foi detetado durante grandes surtos hospitalares. Até à data, e fora do continente europeu foi apenas detetado no Japão (Oliver et al., 2015).

Apesar da enorme disseminação destes clones (ST175 e ST325) denominados de alto risco (devido à sua elevada frequência), existem clones menos frequentes, não associados a fenómenos de disseminação, e que são apenas identificados em determinados locais em determinados surtos. É o caso do clone ST308, que foi identificado em todos os isolados analisados que exibiam um fenótipo XDR e o gene de resistência *bla_{IMP-8}*, num estudo entre julho de 2009 e março de 2012 na Alemanha do Sul (Willmann et al., 2014).

Em 2014, foi isolada uma estirpe XDR de *P. aeruginosa* num Hospital português, resistente aos carbapenemos identificada como ST235. (Botelho, Grosso, Sousa, & Peixe, 2015) A este clone foi associado o gene *bla_{GES-6}* (Botelho et al., 2015; Oliver et al., 2015), constituindo a primeira descrição mundial deste gene em *P. aeruginosa*. As enzimas GES

são responsáveis por conferir uma resistência de largo espectro a diversos antibióticos β -lactâmicos. Além deste gene, foi também identificado o gene *aacA7* que codifica para uma aminoglicosídeo acetiltransferase tipo I – AAC (6') – II. Do que se conhece, este gene conduz a uma resistência à tobramicina, amicacina e netilmicina (Botelho et al., 2015).

Segundo Oliver et al., em 2015, em Portugal além do clone ST235 foi identificado apenas o clone ST111.

2.3 β -lactamases adquiridas de forma horizontal

De acordo com as Tabelas 7-10, é possível identificar as β -lactamases até então adquiridas de forma horizontal em cada ST e o país onde foram identificadas.

O clone de alto risco ST235, apresenta β – lactamases de classe A, B e D. À classe A encontram-se associadas as enzimas BEL, GES, PER e PSE. À classe D encontram-se associadas as enzimas OXA. Em relação às M β LS de classe B, as enzimas FIM e NDM têm sido ocasionalmente reportadas, ao contrário do que acontece com as enzimas VIM e IMP, que além de demonstrarem uma prevalência mais elevada, demonstram simultaneamente uma distribuição mais ampla (Oliver et al., 2015)

Relativamente ao clone ST111, este apresenta β - lactamases adquiridas de forma horizontal, igualmente de classe A, B e D. A sua diferença face ao clone ST235 é que apresenta menos variações nas enzimas presentes em cada classe. As enzimas GES, PSE e VEB são associadas à classe A, as enzimas VIM e IMP à classe B e as enzimas OXA à classe D (Oliver et al., 2015).

Este clone, foi simultaneamente identificado em Instituições de Saúde espanholas, com uma prevalência de 0.3% em 298 isolados resistentes aos carbapenemos, recolhidos durante o ano de 2009 e 2011. O clone ST606 foi igualmente identificado com uma prevalência de 0.6%, sendo a si associado a enzima IMP-15, transportada por 1.3% dos isolados. Este estudo reportou a primeira identificação da enzima IMP-15 na Europa, além da presença de outros genes como bla_{VIM-2} e bla_{VIM-1}, com prevalências de 0.65% e 0.33% respetivamente (Gilarranz et al., 2013).

As β -lactamases adquiridas de forma horizontal no clone de alto risco ST175 são apenas reportadas como sendo de classe B, do tipo IMP, tal como acontece com o clone

ST233, com a diferença que neste clone a enzima associada é do tipo VIM (Oliver et al., 2015).

Em clones com menor prevalência como o caso dos clones ST244, ST357 e ST274 também têm sido associadas enzimas de classes A, B e D, como pode ser consultado na Tabela 9.

Os genes que codificam para estas enzimas são por norma codificados em integrões de classe 1 juntamente com outros determinantes de resistência a aminoglicosídeos. Estes integrões encontram-se por norma localizados em plasmídeos ou em transposões (Viedma et al., 2012), o que permite explicar a sua contribuição para a disseminação destas enzimas.

Pelo descrito pode-se verificar uma elevada diversidade de β – lactamases adquiridas de forma horizontal, o que contribui para explicar o aumento da prevalência de M β LS, e para elucidar a falta de uniformidade na distribuição das β – lactamases tendo em conta que as taxas de prevalência podem variar entre 1% até 50% dependendo da área geográfica (Oliver et al., 2015).

Apesar da aquisição de β – lactamases estar extensivamente descrita, outros fatores contribuem para a resistência e patogenicidade desta bactéria; a sua extraordinária capacidade de sobreviver em basicamente quaisquer condições é um dos exemplos (Olivares et al., 2013). Outro exemplo, que contribui de forma marcante para a patogenicidade de *P. aeruginosa* é a sua capacidade em transportar fatores de virulência.

2.4. Sistema de secreção tipo III (T3SS)

O sistema de secreção tipo III (T3SS) é um complexo macromolecular formado por diversas proteínas que confere um importante determinante de virulência (Galle, Carpentier, & Beyaert, 2012). É constituído por 4 genes de virulência – *exoU*, *exoT*, *exoS* e *exoY* (Koutsogiannou et al., 2013) – e abrange tanto a membrana plasmática da célula hospedeira como a membrana plasmática bacteriana, o peptidoglicano, o espaço periplasmático e o espaço extracelular (Galle et al., 2012).

Este sistema de secreção é considerado um fator essencial para a virulência de bactérias de Gram-negativo, por enviar toxinas diretamente para o citosol durante a interação com as células hospedeiras (Galle et al., 2012).

Um estudo realizado num Hospital Universitário na Grécia, pesquisou a presença deste sistema de secreção em 240 isolados bacterianos, recolhidos durante um período de 2 anos. Neste período, 8% de todas as infeções foram causadas por *P. aeruginosa*. 94.6% dos isolados transportava pelo menos um gene de virulência, ao passo que 33% transportavam os quatro. Dados estatísticos referem ainda que 37.9% dos isolados transportava o gene *exoU* e *exoS* (Koutsogiannou et al., 2013).

Posteriormente, os isolados que transportavam o gene *bla_{VIM-2}* foram identificados como ST235, e os isolados que transportavam o gene *bla_{VIM-1}* como ST111. Apesar de não lhes terem sido associados genes de resistência, os clones ST253, ST309 e ST639 foram simultaneamente identificados (Koutsogiannou et al., 2013).

Também foi avaliada a prevalência de MDRPA nas infeções por *P. aeruginosa*, revelando os resultados que houve um aumento durante o período de estudo – de 49.5% para 63.6% - mas que após os 2 anos as infeções diminuíram para o valor de 38.5% (Koutsogiannou et al., 2013)

2.5. Utilização de bacteriófagos

Novas opções terapêuticas têm sido testadas, como alternativa aos tratamentos existentes pelos antibióticos. O uso de bacteriófagos para combater infeções por microrganismos multirresistentes já foi anteriormente descrito.

Com os objetivos de determinar a diversidade genética de MDRPA e, de testar uma possível atividade *in vitro* de três fagos contra clones de *P. aeruginosa*, um estudo foi realizado em dois hospitais franceses durante janeiro e dezembro de 2010. (Larché et al., 2012)

Em primeiro lugar, foram identificados os clones ST235, ST111, ST229, ST175, ST308 e ST560. As prevalências foram simultaneamente avaliadas, com percentagens de 50% MDRPa pertencentes ao CC235, 14% de ST235, 1.6% ST111, 1.6% ST229, 1.6% de ST175, 0.8% ST308, e 0.8% de ST560. As enzimas IMP-1, VIM-2 e GES-1 foram apenas associadas ao CC235, não tendo sido realizadas pesquisas nos restantes clones (Larché et al., 2012).

Em segundo lugar, obteve-se uma percentagem de 95.4% quanto à suscetibilidade, dos 44 isolados de *P. aeruginosa* utilizados para esta análise, a pelo menos um

bacteriófago da suspensão de fagos. Resistência aos três fagos apenas foi demonstrado por dois isolados do CC235 (Larché et al., 2012).

Com os resultados obtidos, é possível afirmar que novas terapêuticas alternativas utilizando bacteriófagos, são capazes de provocar lise em células de isolados bacterianos multirresistentes.

3. Staphylococcus aureus

Tabela 11 – Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Grupo	Designação do Clone	Prevalência	Localização do estudo	Período do estudo	Grupo de Estudo	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Staphylococcus aureus</i>	HA-MRSA	ST22; ST5; ST8	91% - ST22; 6% - ST5; 4% - ST8	Porto, Portugal	Maió 2009 - Fevereiro 2010	-	<i>mecA</i>	-	TSA; Análise PFGE, <i>SCC_{mec}</i> typing, <i>spa</i> typing, MLST	(Simões et al., 2011)
	HA-MRSA	ST239; ST22; ST80; ST8	53,9% - ST239; 9,8% - ST22; 6,9% - ST80; 4% - ST8	Hospital Universitário de Istambul	Setembro 2007 - Março 2012	102 amostras clínicas de 85 pacientes	<i>MecA</i> ; <i>ermA</i> ; <i>tetM</i> ; <i>fosB</i> ; <i>qacA</i> - <i>ap1B</i> ; <i>ermC</i> ; <i>qac</i> ; <i>mupK</i> ; <i>cat</i> ; <i>tesK</i>	<i>secA</i> ; <i>secE</i> - <i>secE</i> ; <i>secE</i>	TSA; <i>Microarray</i> ; MLST	(Oksuz et al., 2013)
	LA-MRSA	ST398	20% MRSA - ST398 Tet-R	Hospital Universitario de Bellvitge - Barcelona, Espanha	Janeiro 2000 - Junho 2011	164 isolados MRSA Tet-R	<i>mecA</i> ; <i>blaZ</i> ; <i>tet(K)</i> ; <i>tet(M)</i> ; <i>erm(A)</i> ; <i>erm(C)</i> ; <i>qacA</i> - <i>ap1B</i> ; <i>aacD</i> ; <i>cat</i>	<i>gene seb</i> ; <i>hla</i> ; <i>hly</i> ; <i>hly</i> ; <i>HgA</i> ; <i>HgB</i> ; <i>HgC</i> ; <i>crz</i> ; <i>scr</i> ; <i>cak</i> ; <i>chp</i> ; <i>fbpA</i>	TSA, PFGE, <i>SCC_{mec}</i> typing, <i>spa</i> typing, MLST, agr typing, DNA <i>Microarray Hybridization</i>	(Canoz et al., 2013)
	CA-MRSA	ST8	100% dos isolados	Hospital "Neuroboron Nurses" Itália	Setembro 2010 - Outubro de 2010	9 recém-nascidos com infeções da pele e/ou dos tecidos moles causadas por MRSA	<i>mecA</i>	Citotoxina PVL, elemento ACME	TSA, Etest, Vitel2, PCR, <i>SCC_{mec}</i> typing, <i>spa</i> typing, PFGE, MLST	(Sanchini et al., 2013)
	HA-MRSA	MRSA: ST22; ST25; ST8; ST125; ST228; ST36; ST239; ST1; ST80; ST45; MRSA: ST7; ST15; ST5; ST45; ST8; ST30; ST1; ST45; ST22; ST45; ST39; ST101; ST72; ST398; ST188.	69% dos isolados era MRSA, 31% era MRSA*	25 Países Europeus	Janeiro - Julho 2011	3,753 isolados de <i>S. aureus</i> - 453 Hospitais de 25 Países Europeus	-	-	<i>spa</i> typing, MLST, <i>capacitor building</i> , <i>structured survey</i> , análise de dados e ilustrações gráficas	(Grundmann et al., 2014)

Tabela 12 – Continuação do Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Grupo	Designação do Clone	Prevalência	Localização do estudo	Período do estudo	Grupo de Estudo	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Staphylococcus aureus</i>	HA-MRSA, CA-MRSA, LA-MRSA	ST1, ST772, ST2689, ST5, ST1105, ST149, ST225, ST1457, ST2626, ST6, ST8, ST22, ST1327, ST2371, ST30, ST36, ST1456, ST45, ST46, ST508, ST59, ST72, ST80, ST88, ST859, ST97, ST130, ST152, ST111, ST239, ST398, ST140, ST1245, ST1633, ST1943	16% ST6; 17% ST8; 6% ST22; 4% ST80	Hospitais e Serviços de Saúde de Copenhaga	1ª Fase: Janeiro - Maio 2013; 2ª Fase: 2010-2012	341 isolados MRSA	98% <i>mecA</i> , 1% <i>mecC</i>	PVL	multiplex PCR; <i>spa</i> typing; MLST	(Bartels et al., 2015)
	HA-MRSA, CA-MRSA	ST72, ST22, ST8, ST36, ST125, ST5 e ST239	HA-MRSA: 24,3% - ST125; 20,1% - ST5; 20,3% - ST36; 6,3% - ST22; 1,3% - ST239 // CA-MRSA: 9% - ST72; 7,4% - ST8	24 Centros de Saúde em Espanha	Estudo retrospectivo: 2003-2011	457 isolados MRSA	<i>mecC</i>	Citotoxina PVL	SCC _{mec} typing; PCR; <i>spa</i> typing; MLST; PFGE	(Potel, Rey, Otero, Rubio, & Alvarez, 2015)
	HA-MRSA	ST5; ST8; ST239; ST72; ST22; ST1327; ST30; ST1; ST45	23% CC5; 19% CC8; 16% CC22; 11% ST30; 10% ST1; 3% ST45	Hospital Universitário de Zurique, Suíça	Março 2012 - Fevereiro 2014	146 estirpes	-	-	TSA; Análise PFGE; Método Kirby - Bauer; <i>spa</i> typing; MLST	(Seidl et al., 2015)
	HA-MRSA/MSSA	ST146, ST125	0,09% ST146; 0,09% ST125	Clínica HIV em Barcelona, Espanha	Junho 2011- Junho 2012	190 pacientes	<i>mecC</i>	-	TSA; MRSA 'agar medium'; PCR; MLST; SCC _{mec} typing	(Imaz et al., 2015)
	HA-MRSA	ST22	-	2 Hospitais Irlandeses - Irlanda	2012-2013	2 MRSA resistentes ao linezolid isolados de 2 pacientes em Hospitais Irlandeses distintos	<i>mecA</i> , <i>lexA</i> , <i>blaZ</i> , <i>clf</i>	<i>sec</i> , <i>egc</i>	TSA; MLST; SCC _{mec} typing; Investigação dos isolados para o fenótipo PnLOPSA; <i>spa</i> typing; PCR; PFGE; Análise de plasmídeos; WGS	(Shore et al., 2016)

Tabela 13 – Continuação do Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *S. aureus* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Grupo	Designação do Clone	Prevalência	Localização do estudo	Período do estudo	Grupo de Estudo	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA; VRSA	ST22; ST105	-	Hospital em Lisboa, Portugal	Maior de 2013	3 isolados MRSA; 1 isolado VRSA de uma infecção purulenta	<i>mecA</i> , <i>vatA</i>	-	MLST, <i>spa</i> typing, PFGE, PCR multiplex	(Friaes et al., 2014)
<i>Staphylococcus aureus</i>	LRSA	CC5	100%	Hospital em Espanha	2010-2012	1 repuriga de 17 anos com CF	<i>mec</i> , <i>zetaD</i>	-	MALDI-TOF; Etest; MicroScan Walk-Away system; PFGE.	(Román, Roldán, Trincado, Ballesteros, & Carazo, 2013)

Tabela 14 – Continuação do Resumo da análise de estudos de epidemiologia molecular de isolados de *S. aureus* realizados na Europa nos últimos 6 anos.

Bactéria	Grupo	Designação do Clone	Localização - Casos reportados	Grupos Analisados	Resistências Associadas	Genes de Resistência	Fatores de Virulência	Técnicas utilizadas	Referência do estudo
<i>Staphylococcus aureus</i>	MRSA	ST425, ST130, ST1245, ST1526, ST1944, ST1764, ST1943, ST1945, ST1946, ST179, ST599, ST2361	Reino Unido, Dinamarca, Irlanda, Alemanha, França, Espanha e Suíça	-	Resistência aos β-lactâmicos	<i>mecC</i>	-	PCR, <i>spa</i> typing, MLST	(Paterson, Harrison, & Holmes, 2014)

3.1. Resistências descritas

Contrariamente ao que acontece com *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, *S. aureus* é um microrganismo que não possui resistências naturais intrínsecas, razão pela qual se verifica uma maior variedade quantos às suas resistências adquiridas face aos restantes microrganismos. Segundo estudos epidemiológicos moleculares, associada a esta maior variabilidade genética, os clones de *S. aureus* demonstram uma tendência e uma preferência para determinados espaços geográficos (Glasner et al., 2015).

Atualmente, a designação MRSA continua a ser utilizada para definir uma estirpe resistente a todos os β -lactâmicos (Paterson et al., 2014).

Os antibióticos β -lactâmicos, ligam-se às proteínas de ligação às penicilinas (PBP) essencialmente para inibição da formação de peptidoglicano, conduzindo à lise da célula bacteriana. A resistência a esta classe antibiótica nos microrganismos MRSA, é conferida pela aquisição de um elemento genético móvel – SCCmec – que transporta, por norma, o gene *mecA*. Este gene de resistência codifica para uma alteração na PBP nomeadamente PBP2a/PBP2' (Paterson et al., 2014).

3.2 Resistências associadas a estirpes HA-MRSA e CA-MRSA

Inicialmente, estirpes MRSA eram descritas apenas como agentes patogénicos nosocomiais (Oksuz et al., 2013), afetando preferencialmente pacientes imunodeprimidos (Potel, Rey, Otero, Rubio, & Álvarez, 2015). Contudo, nos anos 90 emergiram estirpes CA-MRSA na Austrália e nos EUA (Sanchini et al., 2013), ou seja, estirpes que causam infeção em indivíduos sãos na comunidade, e sem qualquer ligação direta aos serviços prestadores de cuidados de saúde (Imaz et al., 2015; Paterson et al., 2014).

Atualmente, na Europa, as estirpes MRSA ainda são maioritariamente HA-MRSA (Grundmann et al., 2014), apesar de raras exceções como na Dinamarca, por exemplo, onde estas estirpes são raras e associadas aos clones ST6 e ST8 (Bartels et al., 2015).

A grande maioria das estirpes HA-MRSA e CA-MRSA envolve diferentes STs associados, apesar da transferência de estirpes entre ambos os meios ser um problema totalmente reconhecível e atual (Sanchini et al., 2013). A identificação de CA-MRSA tem aumentado em infeções associadas aos meios hospitalares (Potel et al., 2015) e clones HA-MRSA têm sido descritos em infeções na comunidade com uma taxa crescente (Grundmann et al., 2014). Em Espanha, por exemplo, o clone ST72 com elevada

prevalência e disseminação na comunidade, foi simultaneamente isolado em meio hospitalar (Potel et al., 2015).

Apesar da atual transferência entre o meio hospitalar e a comunidade, os clones HA-MRSA e CA-MRSA podem ser diferenciados tendo em conta características epidemiológicas, moleculares e clínicas (Imaz et al., 2015). Os clones HA-MRSA são a priori clones multiresistentes e possuem o elemento genético *SCCmec* type I-III (Potel et al., 2015). Os clones CA-MRSA distinguem-se pela presença de *SCCmec* type IV-VII e pela expressão do fator de virulência leucocidina *Panton – Valentine* (Imaz et al., 2015), demonstrando uma menor resistência aos antibióticos (Potel et al., 2015). Estirpes CA-MRSA que expressem o fator PVL, podem causar surtos hospitalares de forma esporádica, em UCI neonatais e unidades de queimados (Sanchini et al., 2013).

A PVL é uma citotoxina produzida pela espécie *S. aureus* e pode ser detetada, em larga escala, em isolados que causem pneumonia necrotizante ou necrose dos tecidos (Adler, Temper, Block, Abramson, & Moses, 2006). Apesar da sua vasta associação a isolados MRSA, especialmente a CA-MRSA (Paterson et al., 2014) ; (Oksuz et al., 2013), diversos surtos de MSSA expressando PVL têm sido reportados (Adler et al., 2006) ; (Sanchini et al., 2013), o que sugere uma disseminação, virulência e severidade infecciosa (Adler et al., 2006) independente do perfil de resistência do clone (Sanchini et al., 2013).

Em Espanha, entre 2003 e 2011, 72.4% dos isolados MRSA analisados num estudo retrospectivo, eram estirpes HA-MRSA, enquanto apenas 16.4% eram CA-MRSA. Os clones ST125, ST5, ST36, ST22 e ST239 encontravam-se associados às estirpes HA-MRSA, e os clones ST72 e ST8 às estirpes CA-MRSA. A incidência dos clones CA-MRSA aumentou quatro vezes no segundo período de estudo – 2007 a 2011, e a frequência de estirpes MRSA de 9% para 20% ao longo dos oito anos (Potel et al., 2015).

O clone ST125 foi responsável por um surto infeccioso em Espanha em 2006, e mais recentemente na Finlândia, no ano de 2011 (Grundmann et al., 2014).

Ainda no ano de 2011, em Portugal, a prevalência de estirpes MRSA apontava para os 49.1%. Este valor era dos mais elevados na Europa, considerando que a percentagem pode variar consideravelmente de país para país (Simões et al., 2011).

Tendo em conta o valor referido, diversos estudos têm sido conduzidos em Portugal, de modo a avaliar a disseminação de estirpes MRSA, tanto em meio hospitalar

como na comunidade. Entre maio de 2009 e fevereiro de 2010, um estudo avaliou 85 corrimãos de autocarros que circulavam na cidade do Porto.

Um total de 55 isolados de MRSA foram recolhidos de 26% dos autocarros. Foram identificados os clones ST5, ST8 e ST22. O clone ST22 é conhecido internacionalmente como EMRSA-15 e foi identificado com uma prevalência de 91%. Este clone é um dos mais importantes HA-MRSA (Bartels et al., 2015) e é considerado o clone MRSA com maior disseminação em hospitais portugueses, com taxas de crescimento bastante elevadas e com resistência a diversos agentes antibacterianos (Simões et al., 2011).

O facto de, neste estudo (Simões et al., 2011), quase a totalidade dos isolados ter sido identificado como o clone com maior disseminação nos hospitais portugueses – ST22, revela uma problemática de grande importância com a disseminação de um clone associado ao meio hospitalar para a comunidade, e a posterior disseminação na mesma. Esta situação pode ser explicada por inúmeros fatores como o facto de os corrimãos terem sido apenas limpos superficialmente todos os dias e desinfetados a cada três meses, o facto as condições de temperatura e humidade serem as apropriadas para o crescimento deste microrganismo (Kalenic, 2012), e o facto de todos os autocarros, exceto um, incluírem na sua rota uma paragem nas imediações de pelo menos um hospital. Ainda associado, este clone apresenta semelhanças com clones CA-MRSA, o que favorece a sua sobrevivência e persistência na comunidade (Simões et al., 2011).

O clone ST5 revelou semelhanças com o clone ST80, descrito pela primeira vez em Lisboa num estudo com crianças internadas numa urgência pediátrica devido a IPTM (Simões et al., 2011).

O clone ST8, com uma prevalência de apenas 4% no Porto, foi identificado como um clone com 100% de prevalência num surto numa maternidade em Itália. Foi o primeiro caso de um surto por ST8 CA-MRSA numa enfermaria de recém-nascidos na Europa, tendo sido avaliados 9 casos de recém-nascidos com IPTM entre setembro e outubro de 2010 (Sanchini et al., 2013). Estes 9 isolados apresentavam características moleculares semelhantes ao clone USA300 e transportavam a citotoxina PVL e o elemento catabólico móvel da arginina (ACME), responsáveis pela emergência, virulência, disseminação, e severidade dos casos (Sanchini et al., 2013) ; (Shore et al., 2011). O ACME encontra-se largamente relacionado com o clone ST8, sendo ainda responsável pela propagação e sobrevivência deste clone no hospedeiro (Shore et al., 2011). Foi posteriormente

identificado em estirpes deste clone em Istambul (Oksuz et al., 2013). Raras exceções reportam o isolamento do clone ST8 com ausência do elemento ACME e com um *SCCmec* type diferente (Potel et al., 2015).

Ao contrário do que acontece noutros países europeus, como Portugal, em Itália este clone apresenta uma elevada prevalência (Sanchini et al., 2013).

O clone ST22, descrito pela primeira vez no Reino Unido (Grundmann et al., 2014), tem sido o clone com maior prevalência em diversos estudos, como um recentemente realizado nos Açores, que contou com 87% de isolados ST22 (Simões et al., 2011). Este clone foi simultaneamente identificado, em Copenhaga no ano de 2013, em 4 isolados (Bartels et al., 2015), na Alemanha, Hungria e Itália (Grundmann et al., 2014).

Alguns estudos, por se restringirem a amostras clínicas de pacientes de um único hospital, não refletem a epidemiologia molecular e genética desse país; contudo, permitem analisar a diversidade clonal existente em isolados MRSA de diferentes origens geográficas. É o caso do estudo turco já referido, realizado no hospital universitário de Istambul entre 2007 e 2012 (Oksuz et al., 2013). Neste estudo o clone mais prevalente com cerca de 53.9% de prevalência foi o clone ST239, considerado um clone MRSA pandémico, e que, devido à sua distribuição mundial, é internacionalmente designado como clone *Vienna/Hungarian/Brazilian*. Ao mesmo associam-se os genes de resistência operão *bla*, *erm(A)*, *tet(M)*, *tet* efluxo, *fosB*, *aacA – aphD*, *erm(C)*, *qac*, *mupR*, e *cat*. É de realçar que durante o período de estudo, a prevalência deste clone decresceu continuamente, devido aos esforços realizados para controlar a disseminação de MRSA em meio hospitalar. Simultaneamente foi identificado o clone ST22, com 9.8% e com uma distribuição temporal constante ao longo do período de estudo. Este clone transportava consigo *SCCmec* type IV, os genes *tet(K)* e operão *bla* e os fatores de virulência *egc* e *tst-1* (Oksuz et al., 2013).

Na Europa, a incidência de infeções por clones CA-MRSA é relativamente baixa comparada com outros continentes; o clone predominante é o importante clone ST80, conhecido como *European CA-MRSA clone* (Sanchini et al., 2013); (Bartels et al., 2015). Este foi identificado em Istambul, com uma prevalência de 6.9% e associado aos genes operão *bla*, *AphA3*, *sat*, *tet(K)*, *tet* efluxo e *etd* (Oksuz et al., 2013), e na Dinamarca, em 13 pacientes no ano de 2013 (Bartels et al., 2015).

Um estudo realizado no Hospital Universitário de Zurique, entre março de 2012 e fevereiro de 2014, avaliou estirpes MRSA não duplicadas isoladas de processos infecciosos e de colonização. Foram identificados STs, CC e 50 *spa types*. Com 23% de prevalência foi identificado o complexo CC5 que continha o ST5; com 19% o CC8, que continha o ST8, ST239 e o ST72; com 16% o CC22, que continha o ST22 e o ST1327; com 11% o ST30; com aproximadamente 10% o ST1 e com 3% o ST45. Este último clone, CA-MRSA, é conhecido por *Swiss drug clone* e apresentou uma vasta disseminação em Zurique entre 1998 e 2004, em pacientes que utilizavam injetáveis. Atualmente é apenas identificado esporadicamente (Seidl et al., 2015).

O perfil de resistências associado a estes clones era vasto e distinto entre clones, contando com resistências à eritromicina, ciprofloxacina, clindamicina, tetraciclina e gentamicina. Ao contrário do que seria expectável, ocorreu uma diminuição das resistências comparando com estirpes recolhidas no mesmo hospital entre o ano de 2004 e 2006, pela implementação de medidas de prevenção e contenção de infeções (Seidl et al., 2015).

3.3. Gene *mecC*

Além do gene *mecA*, outro gene, originalmente identificado no Reino Unido, Dinamarca e Irlanda em 2011 (Ballhausen, Kriegeskorte, Schleimer, Peters, & Becker, 2014), pode conferir resistência a todos os β -lactâmicos atuando de forma semelhante: gene *mecC*. Apesar de apresentarem uma semelhança de cerca de 70% (Ballhausen et al., 2014), existem diferenças no comportamento das proteínas codificadas por ambos os genes, apesar das suas bases e estrutura evolucionária ainda não se encontrarem totalmente definidas. As estirpes transportadoras deste gene são igualmente capazes de colonizar e infetar seres humanos e outras espécies hospedeiras (Paterson et al., 2014).

No seguimento desta descoberta e caracterização, várias estirpes associadas a um elevado leque de infeções em seres humanos, foram rapidamente identificadas como transportadoras do gene *mecC* em outros países europeus. Apesar de ser um gene atualmente raro, apresenta um potencial problema a nível de diagnóstico por não ser possível utilizar os métodos standard, que estão adaptados à pesquisa do gene *mecA*. A sua presença foi associada aos clones ST425, ST1320, ST1245, ST1526, ST1944, ST1943, ST1945, ST1946, ST2179, ST599 e ST2361. Estes clones não transportavam o fator de virulência PVL nem os genes de evasão imune *sak*, *chp* e *scn* (Paterson et al.,

2014). Estes dados sugerem que o gene *mecC* se encontra disseminado nos países europeus e que se encontra associado a diversos clones MRSA.

Um estudo dinamarquês, analisou 341 isolados MRSA, recolhidos entre janeiro e maio de 2013 e entre 2010 e 2012. Neste estudo, 1% dos isolados transportava o gene *mecC*, enquanto 98% o gene *mecA* (Bartels et al., 2015). Por constituir uma obrigatoriedade a reportação de casos MRSA em seres humanos, sabe-se que neste país foram identificados 1.9% isolados transportadores do gene *mecC* em 2010 e 2.8% em 2011 (Paterson et al., 2014).

Os clones ST6, ST8, ST22 e ST80 foram identificados, com prevalências de, respetivamente, 16%, 17%, 6% e 4% (Bartels et al., 2015). Como pode ser observado na Tabela 12, foram simultaneamente identificados outros clones.

Os 55 isolados ST6, identificados durante o total período de estudo, revelam uma epidemiologia genética bastante semelhante (Bartels et al., 2015).

Na Alemanha, numa coleção de 3207 isolados MRSA, foram identificados apenas dois isolados com o gene *mecC*, com uma prevalência de 0.06%, e sem nenhuma alteração significativa entre os anos de 2004/2005 para 2010/2011 (Paterson et al., 2014).

Num estudo na Turquia, 80% das estirpes MRSA possuía SCC*mec* type III, e tanto estirpes HA-MRSA como CA-MRSA possuíam o fator de virulência PVL. O SCC*mec* type III é um elemento genético móvel responsável pela elevada resistência a múltiplas classes de antibióticos (Oksuz et al., 2013).

Neste estudo, todas as estirpes que transportavam o fator de virulência PVL foram isoladas de IPTM, com exceção de um isolado (Oksuz et al., 2013).

3.4. Estirpes MRSA em pacientes imunocomprometidos

Como já foi referido, por norma as estirpes CA-MRSA causam patogenicidade em indivíduos sãos (Imaz et al., 2015; Paterson et al., 2014), contudo, foi descrito que em determinados grupos populacionais, como os indivíduos positivos para o vírus HIV, a incidência destas estirpes pode conduzir a um aumento do risco de colonização (Imaz et al., 2015).

Em Espanha, com o objetivo de avaliar a prevalência da colonização de estirpes MRSA, foram investigados 190 pacientes positivos para o vírus HIV. Estirpes MRSA

foram detetadas em apenas três pacientes, com prevalência de 1% quando a colonização era nasal e 2% quando a colonização era faríngea. A colonização por estirpes MSSA foi simultaneamente documentada. Os isolados bacterianos foram identificados como ST146 e ST125 e transportavam o elemento genético SCC*mec* type IV. Ao contrário do que seria expectável, não foi observada colonização por estirpes típicas de CA-MRSA nem expressando PVL (Imaz et al., 2015).

Em concordância com outros estudos realizados anteriormente, a prevalência de estirpes MRSA em pacientes HIV – positivos na Europa foi bastante baixa, não tendo sido necessário uma implementação de medidas de controlo infeccioso, associadas a este grupo de risco (Imaz et al., 2015).

3.5. Livestock-associated *S. aureus*

Como já havia sido descrito, *S. aureus* é um relevante agente patogénico humano; contudo, a sua capacidade infecciosa não se restringe somente à espécie humana, sendo capaz de infetar animais. Infeções por este microrganismo, especialmente MRSA, noutras espécies animais, são de particular importância por representarem um reservatório para infeções zoonóticas em humanos (Paterson et al., 2014). Um exemplo que permite é o clone ST398, associado com infeções em gado, e que recentemente tem sido considerado um novo clone em infeções/colonizações em seres humanos. Este clone, associado a colonização humana, foi descrito pela primeira vez em França e na Holanda no ano de 2003 e causa essencialmente infeções da pele e dos tecidos moles (Camoez et al., 2013).

A exposição humana a gado que transporte este clone é um fator de risco para possível colonização ou infeção por MRSA (Camoez et al., 2013).

Um estudo, realizado em Barcelona, teve como objetivo avaliar a prevalência e as características do clone ST398 (LA-MRSA), durante janeiro de 2000 e junho de 2011 no hospital universitário de Bellvitge (Camoez et al., 2013).

Durante este período, 164 isolados MRSA foram recolhidos, sendo 20% identificados como ST398 transportando os genes *mecA* e *bla_Z* – responsável pela resistência à penicilina (El Feghaly, Stamm, Fritz, & Burnham, 2012); dos 33 isolados identificados como ST398, 67% foram recolhidos durante os últimos dois anos de estudo (Camoez et al., 2013). Em 2012 e 2013, respetivamente, tinham sido identificados 232 e

5 isolados ST398 em Copenhaga (Bartels et al., 2015). Estes dados permitem concluir a atual emergência destes clones em seres humanos.

Além dos genes *mecA* e *blaZ*, também os genes *tet(K)* ou *tet(M)*, que conferem resistência à tetraciclina, foram descritos em todos os isolados; genes que conferem resistência à eritromicina, clindamicina – *erm(A)* e *erm(C)* -, à gentamicina – *aacA-aphD* -, à tobramicina – *aadD* -, e ao cloranfenicol – *cat* – foram simultaneamente identificados. Relativamente às resistências reportadas neste estudo, alguns valores são discordantes dos recolhidos em estudos similares ou em outros clones; a resistência à ciprofloxacina por exemplo, foi identificada em 67% dos isolados face à baixa percentagem da resistência a este antibiótico em outros clones; por sua vez, a percentagem de 3% referente ao cotrimoxazol foi considerada baixa tendo em conta que noutros estudos os valores excederam os 88% (Camoez et al., 2013).

De forma geral e em adição à resistência aos β -lactâmicos, 49% dos isolados demonstraram ser resistentes a pelo menos três classes de antibióticos (Camoez et al., 2013).

Além das resistências associadas a este clone, foram simultaneamente pesquisados fatores de virulência. Os fatores de virulência de maior importância para a infeção em seres humanos, como PVL e a toxina da síndrome do choque tóxico, não foram identificados. A ausência destes fatores poderá estar relacionada com o facto destas estirpes não apresentarem um elevado grau infeccioso (Camoez et al., 2013).

Contudo, outros genes que codificam para fatores de virulência foram identificados como os genes *seb*, *hla*, *hly*, *hld*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyC*, *cna*, *scn*, *sak* e *chp*. Os genes *scn*, *sak* e *chp* estão associados à evasão imune e são apenas ativos contra o sistema imune inato na espécie humana (Camoez et al., 2013).

O clone ST398 já foi identificado na França e na Bélgica (Grundmann et al., 2014).

3.6. Resistência à vancomicina

Além da multiresistência adquirida por estirpes MRSA, também outras estirpes resistentes aos antibióticos começam a emergir.

A vancomicina permanece como opção terapêutica de 1ª linha para o tratamento de infecções por estirpes MRSA; contudo, e após a sua primeira identificação em 2002, a preocupação com a emergência e a disseminação de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) tem aumentado (Friães et al., 2014), apesar destas estirpes ainda serem raras a nível mundial. Na Turquia foram reportados 76 isolados que expressavam resistência heterogênea à vancomicina - hVISA (Oksuz et al., 2013).

Em maio de 2013, num hospital de Lisboa, foi isolada de pus de uma ferida polimicrobiana a primeira estirpe VRSA europeia, que transportava o gene *vanA*. Foram simultaneamente identificadas três estirpes MRSA. A estirpe VRSA foi identificada como ST105, dando ênfase à hipótese de que as estirpes pertencentes ao CC5 são mais propensas a adquirir este gene. As estirpes MRSA pertenciam ao ST22, reforçando a ideia de que este é o clone nosocomial mais frequente em Portugal (Friães et al., 2014).

Após o isolamento da estirpe VRSA, a terapêutica empírica instituída foi substituída por amicacina, daptomicina e rifampicina. Na sequência da sua identificação foi iniciado um estudo epidemiológico de modo a monitorizar a sua possível disseminação (Friães et al., 2014).

As estirpes VRSA apresentam características únicas como o facto de não colonizarem qualquer local dos pacientes que infetam (Friães et al., 2014).

O isolamento de estirpes VRSA, MRSA e enterococos resistentes à vancomicina (VRE) sugere que, durante a coinfeção da ferida, o gene *vanA* foi transferido da estirpe VRE para uma estirpe MRSA (Friães et al., 2014).

A emergência destas estirpes é de particular relevância em países com elevada prevalência de MRSA e VRE, pela razão acima enunciada (Friães et al., 2014) e porque a probabilidade de existência de uma coinfeção com estes dois microrganismos é extremamente rara.

3.7. Resistência à linezolid

Resistências à linezolid em estirpes de *S. aureus* foram simultaneamente descritas, e emergiram há alguns anos em diferentes países, em pacientes com fibrose cística (Román, Roldán, Trincado, Ballesteros, & Carazo, 2013). Este agente antimicrobiano, inicialmente introduzido na prática clínica no ano 2000, tornou-se

rapidamente num dos antibióticos de última escolha para tratamento de IPTM em bactérias gram-positivas, como o MRSA (Shore et al., 2016).

A resistência a este antibiótico é adquirida pelas bactérias por três formas diferentes: mutações em genes que codifiquem para proteínas da subunidade 50S, mutações no local alvo do antibiótico, ou aquisição do elemento genético móvel *cfr*. (Shore et al., 2016)

A presença deste gene, conduz a uma metilação no nucleótido adenosina na posição 2503 na subunidade 23S rRNA, o que interfere com o local de ligação da linezolida. Além disso, a presença deste gene afeta os locais de ligação de mais quatro classes de agentes antimicrobianos, e resulta no fenótipo de multirresistência *PhLOPSA*. A sigla deste fenótipo deriva da sua resistência ao cloranfenicol, lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilina e antibióticos estreptogramina A (Shore et al., 2016).

De uma paciente de 17 anos com fibrose cística, admitida num hospital em Espanha, foram isolados diversos microrganismos durante o período de 2010 a 2013. Três estirpes de *S. aureus* foram isoladas e analisadas quanto às suas resistências. Ambas as estirpes transportavam o gene *mec*, e pertenciam ao CC5. Dos mecanismos de resistência habitualmente transportados pelas bactérias para resistência à linezolida, nenhum foi encontrado, mas apresentavam mutações pontuais G2576T e substituições Gly69Ala e Thr70Pro na proteína ribossomal L4, o que contribuiu para uma diminuição da suscetibilidade a este antibiótico (Román et al., 2013).

Foi o primeiro caso clínico reportado de mutações no gene *rplD* associadas *S. aureus* resistentes à linezolida (LRSA) (Román et al., 2013).

Dois isolados LRSA foram também identificadas na Irlanda, em 2012 num hospital em Cork e em 2013 num hospital em Dublin. Ambos foram identificados como ST22 e transportavam o gene de resistência *cfr*, exibindo, portanto, o fenótipo *PhLOPSA*. Além deste elemento genético móvel, foram simultaneamente identificados os genes *fexA*, *blaZ* e *erm(C)*, e os fatores de virulência *sec* e *egc* (Shore et al., 2016).

3.8. Estudo de monitorização repetitivo

Tendo em conta os factos acima referidos, compreende-se que a espécie *S. aureus* devido ao seu potencial como microrganismo responsável por surtos de larga escala e

pela sua estrutura clonal a nível populacional, necessite de meios de monitorização que avaliem a distribuição e a disseminação de clones com elevada importância para a saúde pública. Estes meios de monitorização podem passar por estudos repetitivos que avaliem condições semelhantes em intervalos de tempo e espaço distintos, permitindo uma posterior obtenção de observações consistentes face às mudanças epidemiológicas (Grundmann et al., 2014).

Na mesma linha de pensamento, com o objetivo de investigar mudanças temporais e espaciais em estirpes de *S. aureus*, foram avaliadas estirpes que causadoras de bacteriemia na Europa, explorando a possibilidade de integração destes dados com informações epidemiológicas e clínicas a nível europeu, num estudo repetitivo realizado em 25 países europeus, entre janeiro e julho de 2011. O primeiro estudo foi realizado em 2006 (Grundmann et al., 2014).

Dos 3.753 isolados de pacientes com bacteriemia, 69% foi identificado como MSSA e apenas 31.9% como MRSA. Cinquenta e seis por cento foi identificado com CA-MSSA e 33.4% como CA-MRSA, o que indicou que as estirpes MRSA foram predominantemente adquiridas em meio hospitalar. De acordo com descobertas anteriores, as bacteriémias encontram-se associadas em maior escala a indivíduos do sexo masculino de idade avançada e a estirpes MRSA. Foram identificados 861 *spa types* diferentes, o que revela uma elevada variabilidade genética nos países europeus. Face a 2006, a diversidade genética é semelhante e contínua (Grundmann et al., 2014).

Tal como foi descrito em 2006, uma diferença significativa de 17.1% para 24.4% na mortalidade de infeções por MSSA e MRSA, respetivamente, no ano de 2011, foi explicada pelo risco mais elevado de mortalidade nos pacientes infetados por microrganismos MRSA (Grundmann et al., 2014).

Como pode ser visto na Tabela seguinte, foram identificados inúmeros STs associados a inúmeros *spa types*.

MSSA						MRSA					
Rank	spa type	Multilocus sequence type*	Frequency	%	Cumulative %	Rank	spa type	Multilocus sequence type*	Frequency	%	Cumulative %
1	t091	ST7	138	5.3	5.3	1	t032	ST22	202	17.9	17.9
2	t084	ST15	124	4.7	10.0	2	t003	ST225	99	8.8	26.6
3	t002	ST5	121	4.6	14.6	3	t008	ST8	95	8.4	35.0
4	t015	ST45	98	3.7	18.4	4	t002	ST5	87	7.7	42.7
5	t008	ST8	97	3.7	22.1	5	t067	ST125	50	4.4	47.2
6	t012	ST30	90	3.4	25.5	6	t041	ST228	24	2.1	49.3
7	t127	ST1	83	3.2	28.7	7	t777	ST5	21	1.9	51.2
8	t021	ST30	50	1.9	30.6	8	t018	ST36	20	1.8	52.9
9	t065	ST45	38	1.4	32.1	9	t022	ST22	20	1.8	54.7
10	t026	ST45	34	1.3	33.4	10	t037	ST239	19	1.7	56.4
11	t005	ST22	33	1.3	34.6	11	t127	ST1	18	1.6	58.0
12	t230	ST45	32	1.2	35.9	12	t747	ST22	17	1.5	59.5
13	t216	ST59	28	1.1	36.9	13	t044	ST80	15	1.3	60.8
14	t056	ST101	27	1.0	38.0	14	t2357	ST22	15	1.3	62.1
15	t148	ST72	25	1.0	38.9	15	t024	ST8	14	1.2	63.4
16	t024	ST8	23	0.9	39.8	16	t740	ST45	12	1.1	64.4
17	t346	ST15	23	0.9	40.7	17	t515	ST22	12	1.1	65.5
18	t571	ST398	23	0.9	41.5	18	t6057	ST22	11	1.0	66.5
19	t701	ST8	23	0.9	42.4	19	t030	ST239	9	0.8	67.3
20	t189	ST188	21	0.8	43.2	20	t014	ST225	9	0.8	68.1
Other	-	-	1,489	56.8	100.0	other	-	-	361	31.9	100.0
Total			2,621	100		Total			1,130	100	

Tabela 15 – Os 20 *spa types* mais frequentemente isolados de estirpes MSSA e MRSA, num estudo realizado em 25 países europeus, no ano de 2011 (Grundmann et al., 2014).

Da análise da Tabela 15, o isolado ST7 e o isolado ST22 são os mais predominantes em bacteriémias causadas por estirpes MSSA e MRSA, respetivamente. O ST22 é o clone predominante em todo o estudo, e é mencionado diversas vezes associado a um *spa type* diferente, e associado tanto a estirpes MSSA como MRSA. Relativamente ao ano de 2006, todos, exceto um *spa type*, associados ao clone ST22 aumentaram de frequência, com uma prevalência de 36% no ano de 2011 (Grundmann et al., 2014).

Para as estirpes MRSA, que para a análise desta monografia apresentam maior importância, o top 20 de *spa types* continha 68.1% de todos os isolados. É de salientar que apesar da maioria dos clones ter apresentado um aumento de prevalência nos últimos cinco anos, alguns clones descreveram um padrão contrário, com um decréscimo na sua frequência: o clone ST8 com uma diminuição de 12.4% para 8.4%, o clone ST228 de 7.4% para 2.1%, e o clone ST239 de 2.1% para 0.8% (Grundmann et al., 2014). Em países com baixa prevalência de estirpes MRSA, as infeções por estirpes MSSA constituem um problema maior do que infeções por MRSA (Lindqvist et al., 2015).

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

Para *A. baumannii* a literatura apresentada refere países da Europa do Sul, como Itália, Espanha, Turquia e Grécia, como sendo países onde a prevalência de resistência aos carbapenemos é maior. Além deste facto, é ainda possível afirmar que alguns clones e respetivos genes associados já se encontram disseminados em Portugal.

Tendo em conta que o clone ST2 é o clone com maior prevalência nos estudos analisados neste trabalho, pode sugerir-se que este é o clone mais prevalente com resistências a carbapenemos na Europa. A explicação pode estar relacionada com a elevada eficiência na formação de biofilmes e aderência a superfícies abióticas o que favorece a sua disseminação e persistência no ambiente hospitalar (Principe et al., 2014).

Os resultados analisados são concordantes com a prévia descrição de um aumento da disseminação mundial do gene *bla_{OXA-23}*.

Para *P. aeruginosa* os clones ST235, ST111 e ST175 são os clones com maior prevalência na Europa. Por norma o clone ST235 é o clone mais prevalente dos três, exceto em situações específicas. As enzimas VIM e IMP são as mais disseminadas, também por se encontrarem associadas aos clones com maior prevalência, e têm sido reportadas não só a nível europeu, como a nível mundial (Wright et al., 2015). O gene *blavim-2* é o gene associado à resistência a carbapenemos mais frequente nos países da Europa do Sul (Koutsogiannou et al., 2013).

O facto de uma nova enzima indutora de resistência aos carbapenemos – IMP-31 – ter sido identificada e caracterizada, indica uma evolução e disseminação de carbapenemases em estirpes clínicas de *P. aeruginosa* e alerta para a necessidade na continuação da prevenção de infeções por microrganismos gram-negativos.

A versatilidade desta bactéria associada à sua hábil capacidade em combinar diferentes mecanismos de resistência e fatores de virulência, limita severamente as opções de tratamento utilizadas (Multidrug-resistant et al., 2012), sendo necessário pesquisar novas abordagens terapêuticas.

Para *S. aureus* os clones mais predominantes em estirpes HA-MRSA na Europa no período analisado foram os clones ST22, ST125 e ST5; enquanto que os clones mais predominantes em CA-MRSA foram ST8 e ST80.

O aumento da prevalência de resistências a antibióticos como a vancomicina e a linezolida e a utilização de bacteriófagos reforça a importância da implementação de medidas de controle de infecção nesta espécie.

A emergência de estirpes multirresistentes e a sua disseminação, é um problema atual e relevante. Os estudos analisados sugerem que ao longo dos anos a prevalência e emergência de diversos clones multirresistentes e respectivos genes de resistência associados é cada vez maior, reforçando para uma necessidade na implementação de medidas de controle infeccioso.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, A., Temper, V., Block, C. S., Abramson, N., & Moses, A. E. (2006). Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* [1]. *Emerging Infectious Diseases*, 12(11), 1789–1790. <http://doi.org/10.3201/eid1211.060726>
- Ahmed, S. S., & Alp, E. (2015). Genotyping methods for monitoring the epidemic evolution of *A. baumannii* strains. *Journal of Infection in Developing Countries*, 9(4), 347–354. <http://doi.org/10.3855/jidc.6201>
- Ali, A., Botha, J., & Tiruvoipati, R. (2014). Fatal skin and soft tissue infection of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: A case report. *International Journal of Surgery Case Reports*, 5(8), 532–536. <http://doi.org/10.1016/j.ijscr.2014.04.019>
- Antunes, L. C. S., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: Evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292–301. <http://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Ballhausen, B., Kriegeskorte, A., Schleimer, N., Peters, G., & Becker, K. (2014). The *mecA* homolog *mecC* confers resistance against β -lactams in *Staphylococcus aureus* irrespective of the genetic strain background. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3791–3798. <http://doi.org/10.1128/AAC.02731-13>
- Barroso, H., Meliço - Silvestre, A., & Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica 1*. (LIDEL - Edições Técnicas Lda, Ed.). Lisboa.
- Bartels, M. D., Larner-Svensson, H., Meiniche, H., Kristoffersen, K., Schonning, K., Nielsen, J. B., ... Westh, H. (2015). Monitoring meticillin resistant *Staphylococcus aureus* and its spread in Copenhagen, Denmark, 2013, through routine whole genome sequencing. *20(17)*, 1–9.
- Basak, S., Singh, P., & Rajurkar, M. (2016). Multidrug Resistant and Extensively Drug Resistant Bacteria: A Study. *Journal of Pathogens*, 2016, 1–5. <http://doi.org/10.1155/2016/4065603>
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153 Suppl (January), S347–S357. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>

- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(December), 42–51. <http://doi.org/10.1039/c0cc05111j>
- Botelho, J., Grosso, F., Sousa, C., & Peixe, L. (2015). Characterization of a new genetic environment associated with ges-6 carbapenemase from a pseudomonas aeruginosa isolate belonging to the high-risk clone st235. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(2), 615–617. <http://doi.org/10.1093/jac/dku391>
- Camoez, M., Sierra, J. M., Pujol, M., Hornero, A., Martin, R., & Domínguez, M. A. (2013). Prevalence and Molecular Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus ST398 Resistant to Tetracycline at a Spanish Hospital over 12 Years. *PLoS ONE*, 8(9), 5–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0072828>
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Costello, A., Davies, T. A., & Jones, R. N. (2014). Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible pseudomonas aeruginosa collected during 2009-11 in 14 european and mediterranean countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(7), 1804–1814. <http://doi.org/10.1093/jac/dku048>
- Ciofi Degli Atti, M., Bernaschi, P., Carletti, M., Luzzi, I., García-Fernández, A., Bertaina, A., ... Raponi, M. (2014). An outbreak of extremely drug-resistant Pseudomonas aeruginosa in a tertiary care pediatric hospital in Italy. *BMC Infectious Diseases*, 14, 494. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-494>
- Cramer, N., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2010). Clonal epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 526–533. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.004>
- Cunha, B. (2016). *Acinetobacter* medication. Visto a 25 de Setembro de 2016 em <http://emedicine.medscape.com/article/236891-medication#1>
- Da Silva, G. J., Mendonça, N., Batista, G., & Duarte, A. (2010). Sequence types of Portuguese carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates collected over 10 years. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10), 2254–2256. <http://doi.org/10.1093/jac/dkq274>

- Dijkshoorn, L., Ursing, B. M., & Ursing, J. B. (2000). Strain, clone and species: Comments on three basic concepts of bacteriology. *Journal of Medical Microbiology*, 49(5), 397–401.
- Durmaz, R., Otlu, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y., ... Caliskan, A. (2009). The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 62(5), 372–377.
- El Feghaly, R. E., Stamm, J. E., Fritz, S. A., & Burnham, C. A. D. (2012). Presence of the blaZ beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74(4), 388–393. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.013>
- Friães, A., Resina, C., Manuel, V., Lito, L. M., Ramirez, M., & Melo-Cristino, J. (2014). Epidemiological survey of the first case of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in Europe. *Epidemiology and Infection*, 5, 1–4. <http://doi.org/10.1017/S0950268814001423>
- Galle, M., Carpentier, I., & Beyaert, R. (2012). Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 831–42. <http://doi.org/10.2174/138920312804871210>
- Gardete, S., & Tomasz, A. (2014). Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7), 2836–40. <http://doi.org/10.1172/JCI68834.2836>
- Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F. J., Artiles, F., Alamo, I., & Oliver, A. (2013). First detection in Europe of the metallo-beta-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.*, (1469-0691 (Electronic)).
- Gillespie, S., & Hawkey, P. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. (S. Gillespie & P. Hawkey, Eds.) (2^a Edição). West Sussex: Wiley.

- Glasner, C., Pluister, G., Westh, H., Arends, J. P., Empel, J., Giles, E., ... van Dijl, J. M. (2015). Staphylococcus aureus spa type t437: Identification of the most dominant community-associated clone from Asia across Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(2), 163.e1–163.e8. <http://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.09.010>
- Grosso, F., Silva, L., Sousa, C., Ramos, H., Quinteira, S., & Peixe, L. (2015). Extending the reservoir of bla IMP-5: the emerging pathogen Acinetobacter bereziniae. *Future Microbiology*, 10(10), 1609–1613. <http://doi.org/10.2217/fmb.15.88>
- Grundmann, H., Schouls, L. M., Aanensen, D. M., Pluister, G. N., Tami, A., Chlebowicz, M., ... Friedrich, A. W. (2014). The dynamic changes of dominant clones of Staphylococcus aureus causing bloodstream infections in the European region: results of a second structured survey. *PLoS ONE*, 9(49), 1–10. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.49.20987>
- Imaz, A., Camoez, M., Di Yacovo, S., Gasch, O., Dominguez, M. A., Vila, A., ... Podzamczar, D. (2015). Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in HIV-infected patients in Barcelona, Spain: a cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 243. <http://doi.org/10.1186/s12879-015-0991-z>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. <http://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jeannot, K., Diancourt, L., Vaux, S., Thouverez, M., Ribeiro, A., Coignard, B., ... Brisse, S. (2014). Molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible Acinetobacter baumannii in France. *PLoS ONE*, 9(12), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0115452>
- Kalenić, S. (2012). The importance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in human medicine. *Medical Sciences*, 37(November), 61–72.
- Kang, C. I., Song, J. H., Ko, K. S., Chung, D. R., & Peck, K. R. (2011). Clinical features and outcome of Staphylococcus aureus infection in elderly versus younger adult patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(1), e58–e62. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.09.012>

- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., & Samuelsen, ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates*, 15(4), 237–247. <http://doi.org/10.1016/j.drup.2012.06.001>
- Kempf, M., & Rolain, J. M. (2012). Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: Clinical impact and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(2), 105–114. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004>
- Koutsogiannou, M., Drougka, E., Liakopoulos, A., Jelastopulu, E., Petinaki, E., Anastassiou, E. D., ... Christofidou, M. (2013). Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(2), 665–668. <http://doi.org/10.1128/JCM.03071-12>
- Larché, J., Pouillot, F., Essoh, C., Libisch, B., Straut, M., Lee, J. C., ... Pourcel, C. (2012). Rapid identification of international multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis and investigation of their susceptibility to lytic bacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6175–6180. <http://doi.org/10.1128/AAC.01233-12>
- Larsen, M. V, Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, L., ... Lund, O. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria, 1355–1361. <http://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lee, Y., D'Souza, R., Yong, D., & Lee, K. (2016). Prediction of putative resistance islands in a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 2 clinical isolate. *Annals of Laboratory Medicine*, 36(4), 320–324. <http://doi.org/10.3343/alm.2016.36.4.320>
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <http://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Lindqvist, M., Isaksson, B., Swanberg, J., Skov, R., Larsen, A. R., Larsen, J., ... Hällgren, A. (2015). Long-term persistence of a multi-resistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MR-MSSA) clone at a university hospital in southeast Sweden, without further transmission within the region. *European Journal of*

- Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(7), 1415–1422.
<http://doi.org/10.1007/s10096-015-2366-1>
- Lindstedt, B. A., Torpdahl, M., Vergnaud, G., Hello, S. Le, Weill, F. X., Tietze, E., & Malorny, B. (2012). Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries , 2012, 1–10.
- Magiorakos, a, Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Hindler, J. F. (2011). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Microbiology*, 18(3), 268–281.
<http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mamina, C., Palma, D., Bonura, C., Aleo, A., Fasciana, T., Sodano, C., ... Tetamo, R. (2012). Epidemiology and clonality of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from an intensive care unit in Palermo, Italy. *BMC Research Notes*, 5(1), 365. <http://doi.org/10.1186/1756-0500-5-365>
- Matsuo, M., Cui, L., Kim, J., & Hiramatsu, K. (2013). Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(12), 5843–5853. <http://doi.org/10.1128/AAC.00425-13>
- Mendes, J. (2010). Resistência Antibiótica no *Staphylococcus Aureus*; da Investigação Básica à Prática Clínica. *Rev Port Med Int*, 17(1), 11–15.
- Nikaido, H. (2010). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem.*, (2), 119–146.
<http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923.Multidrug>
- Nutman, A., Glick, R., Temkin, E., Hoshen, M., Edgar, R., Braun, T., & Carmeli, Y. (2014). A case-control study to identify predictors of 14-day mortality following carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20, 1028–34. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12716>
- Oikonomou, O., Sarrou, S., Papagiannitsis, C. C., Georgiadou, S., Mantzaris, K., Zakynthinos, E., ... Petinaki, E. (2015). Rapid dissemination of colistin and

- carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Central Greece: mechanisms of resistance, molecular identification and epidemiological data. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 559. <http://doi.org/10.1186/s12879-015-1297-x>
- Oksuz, L., Dupieux, C., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., & Gurler, N. (2013). The high diversity of MRSA clones detected in a university hospital in Istanbul. *International Journal of Medical Sciences*, 10(12), 1740–1745. <http://doi.org/10.7150/ijms.6438>
- Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., Sanchez, M. B., & Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 4(APR), 1–15. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00103>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21-22, 41–59. <http://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- Paterson, G. K., Harrison, E. M., & Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 22(1), 42–47. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>
- Paun, O., & Schönswetter, P. (2012). Europe PMC Funders Group Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic , transcriptomic and epigenetic studies, 75–87. <http://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8>
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3471–3484. <http://doi.org/10.1128/AAC.01464-06>
- Pfennigwerth, N., Geis, G., Gatermann, S. G., & Kaase, M. (2014). Description of IMP-31, a novel metallo- β -lactamase found in an ST235 *Pseudomonas aeruginosa* strain in Western Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(7), 1973–1980. <http://doi.org/10.1093/jac/dkv079>
- Potel, C., Rey, S., Otero, S., Rubio, J., & Álvarez, M. (2015). Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from the community in Spain: Emergence of clone sequence type 72. *Journal of Hospital Infection*, 10–13. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.03.012>

- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(6), 568–585. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
- Principe, L., Piazza, A., Giani, T., Bracco, S., Caltagirone, M. S., Arena, F., ... Stefani, S. (2014). Epidemic diffusion of OXA-23-producing *acinetobacter baumannii* isolates in Italy: Results of the first cross-sectional countrywide survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 3004–3010. <http://doi.org/10.1128/JCM.00291-14>
- Purrello, S. M., Daum, R. S., Edwards, G. F. S., Lina, G., Lindsay, J., Peters, G., & Stefani, S. (2014). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(2), 61–69. <http://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.02.003>
- Qureshi, Z. A., Hittle, L. E., O'Hara, J. A., Rivera, J. I., Syed, A., Shields, R. K., ... Doi, Y. (2015). Colistin-resistant *acinetobacter baumannii*: Beyond carbapenem resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 60(9), 1295–1303. <http://doi.org/10.1093/cid/civ048>
- Román, F., Roldán, C., Trincado, P., Ballesteros, C., & Carazo, C. (2013). Detection of linezolid-resistant *staphylococcus aureus* with 23S rRNA and novel L4 riboprotein mutations in a cystic fibrosis patient in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2428–2429. <http://doi.org/10.1128/AAC.00208-13>
- Sanchini, A., Spitoni, M. G., Monaco, M., Raglio, A., Grigis, A., Petrò, W., ... Pantosti, A. (2013). Outbreak of skin and soft tissue infections in a hospital newborn nursery in Italy due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *Journal of Hospital Infection*, 83(1), 36–40. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.09.017>
- Seidl, K., Leimer, N., Palheiros Marques, M., Furrer, A., Holzmann-Bürgel, A., Senn, G., ... Zinkernagel, A. S. (2015). Clonality and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the University Hospital Zurich, Switzerland between 2012 and 2014. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 14. <http://doi.org/10.1186/s12941-015-0075-3>

- Shore, A. C., Lazaris, A., Kinnevey, P. M., Brennan, O. M., Brennan, G. I., O'Connell, B., ... Coleman, D. C. (2016). First Report of *cfr* -Encoding Plasmids in the Pandemic Sequence Type (ST) 22 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type-IV Clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(March), AAC.02949–15. <http://doi.org/10.1128/AAC.02949-15>
- Shore, A. C., Rossney, A. S., Brennan, O. M., Kinnevey, P. M., Humphreys, H., Sullivan, D. J., ... Coleman, D. C. (2011). Characterization of a novel arginine catabolic mobile element (ACME) and staphylococcal chromosomal cassette *mec* composite island with significant homology to *Staphylococcus epidermidis* ACME type II in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotype . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1896–1905. <http://doi.org/10.1128/AAC.01756-10>
- Simões, R. R., Aires-de-Sousa, M., Conceição, T., Antunes, F., da Costa, P. M., & de Lencastre, H. (2011). High prevalence of EMRSA-15 in Portuguese public buses: A worrisome finding. *PLoS ONE*, 6(3), 1–5. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017630>
- Smith, T. C., & Wardyn, S. E. (2015). Human Infections with *Staphylococcus aureus* CC398. *Current Environmental Health Reports*, 2(1), 41–51. <http://doi.org/10.1007/s40572-014-0034-8>
- Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2007). Europe PMC Funders Group Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* : Methicillin resistance, 85(Pt 1), 1–14.
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* : A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment, 2(1), 25–32. <http://doi.org/10.7508/iem.2016.01.008>
- Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254–267. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: An emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/541340>

- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661. <http://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Uhlemann, A. C., Otto, M., Lowy, F. D., & DeLeo, F. R. (2014). Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 563–574. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.030>
- Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., ... Chaves, F. (2012). VIM-2–producing Multidrug-Resistant, 18(8), 1235–1242.
- Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11. <http://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
- Willmann, M., Bezdan, D., Zapata, L., Susak, H., Vogel, W., Schröppel, K., ... Peter, S. (2014). Analysis of a long-term outbreak of XDR Pseudomonas aeruginosa: A molecular epidemiological study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(5), 1322–1330. <http://doi.org/10.1093/jac/dku546>
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736–755. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Wright, L. L., Turton, J. F., Livermore, D. M., Hopkins, K. L., & Woodford, N. (2015). Dominance of international “high-risk clones” among metallo- β -lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1), 103–110. <http://doi.org/10.1093/jac/dku339>
- Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., & Tsakris, A. (2013). Global evolution of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii clonal lineages. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(1), 11–19. <http://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008>