

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização dos mecanismos de resistência à ampicilina
em estirpes clínicas de *Haemophilus influenzae* isoladas em
Portugal entre o período de 2009 a 2012**

Elsa Cristina Barrulas Guilherme

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Caracterização dos mecanismos de resistência à ampicilina
em estirpes clínicas de *Haemophilus influenzae* isoladas em
Portugal entre o período de 2009 a 2012**

Elsa Cristina Barrulas Guilherme

**Dissertação orientada pela Doutora Maria Paula Bajanca-Lavado
(INSA) e co-orientado pela Professora Doutora Deodália Dias (FCUL)**

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2013

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, em Lisboa, na pessoa do seu director, Doutor José Pereira Miguel, agradeço por me ter permitido realizar na Unidade de Resistência aos antibióticos e no Laboratório de Referência de Infecções Respiratórias, a totalidade do trabalho experimental apresentado nesta dissertação.

À Doutora Maria Paula Bajanca-Lavado, Investigadora do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, pela orientação prestada, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, pela boa-disposição e agrado com que sempre me tratou, por toda a ajuda, apoio, paciência e confiança em mim depositada, o meu profundo agradecimento.

À Professora Doutora Deodália Dias, professora e coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, por me ter possibilitado a realização desta tese, por toda a ajuda, apoio e disponibilidade.

À Célia Bettencourt, do Laboratório Nacional de Referência de Infecções Respiratórias – Agentes Bacterianos, por toda a sua ajuda, companheirismo, boa disposição e simpatia, muito obrigada.

À Professora Doutora Cecília Galvão pelo apoio e ajuda que sempre me deu para a concretização desta dissertação de mestrado, e sem a qual nunca teria sido possível.

À Professora Doutora Cláudia Faria, por todo o apoio, ajuda, e paciência. Pelo conhecimento transmitido, pela disponibilidade e pelas críticas construtivas ao trabalho. Nunca esquecerei a sua ajuda, e por isso, os meus profundos agradecimentos.

Aos meus amigos e colegas, Alda, Mara, João, Ana Isabel, Cláudia, pelo companheirismo, pela motivação e alegria que sempre partilharam comigo.

Ao André, pela sua ajuda e pela força dada ao longo deste trabalho.

Ao meu Celinho, por tudo! Obrigado meu amor, pela compreensão, paciência e apoio, por seres quem és, e por estares sempre presente na minha vida!

À minha querida avó Matilde, que eu nunca esquecerei e que estará para sempre no meu coração e pensamento!

E por fim, um agradecimento muito especial e com muito carinho aos meus pais e à minha irmã mais linda, que eu mais amo neste mundo, por todo o incentivo, pelo apoio constante e incondicional em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, isto nunca teria sido possível. É a vós que dedico este trabalho!

Publicações no âmbito deste trabalho:

Guilherme E. and Bajanca-Lavado MP. “Characterization of ampicillin resistance mechanisms in clinical *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal between 2009 and 2012”. Poster (nº 58) apresentado no EMGM meeting (European Monitoring Group on Meningitis), 17-19 Setembro 2013, Austria.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

As abreviaturas utilizadas ao longo do texto encontram-se aqui por ordem alfabética, seguida da correspondente definição. As abreviaturas foram introduzidas e explicadas entre parênteses à medida que vão surgindo no texto. Estas foram mantidas de acordo como são reconhecidas internacionalmente, sendo incluída a tradução mais próxima para a língua portuguesa.

μl - Microlitro

μg – Micrograma

mg - Miligrama

ml – Mililitro

mM – Milimolar

adK – Adenilato cinase, do inglês “*Adenylate kinase*”

Amc - Amoxicilina – Ácido Clavulânico

Amp – Ampicilina

atpG – ATP sintetase, do inglês “*ATP synthase gamma chain*”

Azi – Azitromicina

bexA – gene que codifica a cápsula de Hi

Bla- - β-lactamase negativo

Bla+ - β-lactamase positivo

BLNAR – Não produtoras de β-lactamase, resistentes à ampicilina

BLNAS – Não produtoras de β-lactamase negativas, suscetíveis à ampicilina

BLPACR – Produtoras de β-lactamase, resistentes à ampicilina e co-amoxiclave

BLPAR – Produtoras de β-lactamase, resistentes à ampicilina

C – Cloranfenicol

CC – Complexo clonal

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

Cfr – Cefaclor

Cft – Cefotaxima

CIM – Concentração inibitória mínima

CIM₅₀ – Concentração mínima inibitória necessária para inibir o crescimento de 50% dos organismos

CIM₉₀ - Concentração mínima inibitória necessária para inibir o crescimento de 90% dos organismos

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Cp – Ciprofloxacina

Cpe – Cefepime

Crn – Cefuroxima

dATP – 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato

dCTP – 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato

dGTP – 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato

DLVs – *Double locus variants*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

dTTP – 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato

E. coli - *Escherichia coli*

ESBL – β -lactamase de largo espectro

ExoSAP-IT – Enzimas hidrolíticas, uma exonuclease e uma fosfatase

FASTA - Formato baseado em texto para representar tanto sequências de nucleótidos

frdB – Fumarato redutase, do inglês "*Fumarate reductase iron-sulfur subunit*"

ftsI – Gene que codifica as PBP3

fucK – Fucose cinase, do inglês "*Fucose kinase*"

GlcNAc – N-acetilglucosamina

Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b

HiNC – *Haemophilus influenzae* não capsulado

HTM - *Haemophilus* Test Medium

I – Intermédio

LBA – Lavado alveolar, brônquico e brônco-alveolar

LOS – Lipooligossacarídeos

LPS – Lipopolissacáridos

mdH – Malato desidrogenase, do inglês “*Malate dehydrogenase*”

Mer – Meropenem

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Misc – Miscelâneo

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

MurNAc – N-acetil murâmico

NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NC – Não capsulado

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBP – Proteína de ligação à penicilina

PCR – Polymerase Chain Reaction

PD – Proteína D

pgi – Glucose-6-fosfato isomerase, do inglês “*Glucose-6-phosphate isomerase*”

PNV – Plano Nacional de Vacinação

PRP – Polirribosil-Ribitol-Fosfato

R – Resistente

recA – Proteína RecA

Rif – Rifampicina

RNA – Ácido ribonucleico

ROB-1 – Enzima β-lactamase codificada pelo gene *bla*_{ROB-1}

S – Suscetível

SLVs – *Single locus variants*

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

ST – *Sequence Type*

SXT – Trimetoprima-Sulfometoxazol

TBE - Tampão Tris-borato-EDTA

Te – Tetraciclina

TEM-1 – Enzima β -lactamase codificada pelo gene *bla*_{TEM-1}

TEM-2 – Enzima β -lactamase codificada pelo gene *bla*_{TEM-2}

Tn - Transposição

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência

UPGMA - *“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”*

WHO – *World Health Organization*

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. Introdução.....	1
1.1 Perspetiva histórica.....	1
1.2 Género <i>Haemophilus</i>	1
1.3 Patogénese.....	3
1.4 Vacina contra <i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b (Hib)	5
1.5 Antibióticos	7
1.5.1 β -lactâmicos	8
1.5.1.1 Penicilinas	9
1.5.1.2 Cefalosporinas	10
1.5.1.3 Carbapenemes	11
1.5.1.4 Inibidores de β -lactamases	12
1.6 Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos	12
1.7 Mecanismo de resistência enzimático em <i>Haemophilus influenzae</i>	13
1.8 Mecanismo de resistência não enzimático em <i>Haemophilus influenzae</i>	14
1.9 Resistência Combinada	17
1.10 Objetivos	17
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1 Amostragem.....	19
2.2 Extração de DNA	20
2.3 Produção de β -lactamase	20
2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	20
2.5 Detecção e caracterização da cápsula em estirpes de <i>H. influenzae</i>	21
2.6 Genes responsáveis pela produção de β -lactamases por PCR Multiplex.....	22
2.7 Detecção de mutações no gene <i>ftsI</i> que codifica a PBP3.....	23
2.8 Purificação.....	24
2.9 Sequenciação do gene <i>ftsI</i>	24
2.10 <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	25
2.11 Análise Estatística.....	26

3. Resultados.....	28
3.1 Caracterização das amostras de <i>H. influenzae</i>	28
3.2 Suscetibilidade aos antibióticos.....	29
3.3 Cápsula e a Suscetibilidade aos Antibióticos	31
3.4 Produção de β -lactamase	32
3.5 Mutações no gene <i>ftsI</i> que codifica a PBP3.....	32
3.6 Relação entre os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos e os genótipos de resistência.....	36
3.7 Evolução dos mecanismos de resistência em estirpes clínicas de <i>H. influenzae</i> aos antibióticos β -lactâmicos	40
3.8 Natureza filogenética dos genótipos gBLNAR e gBLPACR por <i>Multilocus Sequence Typing</i>	43
4. Discussão.....	48
4.1 Suscetibilidade aos antibióticos.....	48
4.2 Cápsula e Suscetibilidade aos antibióticos	49
4.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.....	50
4.3.1 Mecanismo enzimático mediado pela produção de β -lactamase.....	51
4.3.2 Mecanismo não enzimático mediado por alterações nas PBP3.....	51
4.4 Relação entre os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos e os genótipos de resistência.....	54
4.5 Evolução dos mecanismos de resistência em estirpes clínicas de <i>H. influenzae</i> aos antibióticos β -lactâmicos	56
4.6 Natureza filogenética dos genótipos gBLNAR e gBLPACR	58
Considerações Finais	59
Referências	61
Anexos	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Haemophilus influenzae</i>	2
Figura 2 - Países onde a vacina Hib foi introduzida, entre 1997 e 2012.....	6
Figura 3 - Mecanismos de ação dos antibióticos	8
Figura 4 - Estrutura química geral da penicilina e da ampicilina	10
Figura 5 - Estrutura química de algumas cefalosporinas..	11
Figura 6 - Estrutura química geral do Carpaneme e do Meropenem	11
Figura 7 - Amplificação dos 7 fragmentos internos conservados em <i>H. influenzae</i>	43
Figura 8 - Distribuição dos STs identificados por complexos clonais e “ <i>singletons</i> ”	44
Figura 9 - Dendograma obtido pelo método de UPGMA.....	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espectro clínico de infeções causadas por <i>Haemophilus influenzae</i>	4
Tabela 2 - Origem das estirpes clínicas de <i>H. influenzae</i> isoladas em Portugal entre o período de 2009-2012.....	19
Tabela 3 - Critérios interpretativos, segundo o CLSI, dos antibióticos em estudo, na determinação da suscetibilidade em <i>H. influenzae</i>	21
Tabela 4 - Características dos pacientes, tipo de amostra e suscetibilidade à ampicilina das estirpes em estudo, isoladas em Portugal entre o período de 2009-2012.....	28
Tabela 5 - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes clínicas de <i>H. influenzae</i> , de acordo com a classe de resistência e <i>breakpoints</i> do CLSI.....	30
Tabela 6 - Suscetibilidade das estirpes clínicas de <i>H. influenzae</i> aos antibióticos em estudo, de acordo com a cápsula e produção de β -lactamase.....	31
Tabela 7 - Substituições aminoacídicas identificadas na região da transpeptidase do gene <i>ftsI</i>	34
Tabela 8 - Distribuição das estirpes por genótipos e respetiva percentagem na amostra total.	36
Tabela 9 - Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos das estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos.....	38
Tabela 10 - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes estudadas, em dois períodos, 2001-2008 e 2009-2012, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos.....	40
Tabela 11 - Comparação do número de estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos e número de padrões mutacionais em dois períodos: 2001-2008 e 2009-2012.....	42
Tabela 12 - Resultados obtidos por MLST para os isolados <i>H. influenzae</i> BLNAR dos grupos mutacionais IIb, IId e III-like, e para os isolados BLPACR dos grupos mutacionais IIb e IId.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I - Sequências de <i>primers</i> utilizados para amplificação da região específica da cápsula (Falla <i>et al.</i> 1994), dos genes <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{ROB} (Mendonça <i>et al.</i> , 2006) e os tamanhos dos produtos esperados.....	I
Anexo II - Sequências de <i>primers</i> utilizados para amplificação e sequenciação do gene <i>ftsI</i> (Cerquetti <i>et al.</i> , 2007).	II
Anexo III - Nomenclatura dos 20 aminoácidos essenciais	III
Anexo IV - Sequências de <i>primers</i> utilizados para amplificação da região específica dos 7 genes bem conservados em <i>H. influenzae</i> (Meats <i>et al.</i> 2003) e os tamanhos dos produtos esperados..	IV
Anexo V - Suscetibilidade das estirpes clínicas (total) de <i>H. influenzae</i> aos antibióticos em estudo, de acordo com o genótipo de resistência e <i>breakpoints</i> do CLSI (2012).	V
Anexo VI - Suscetibilidade das estirpes clínicas (total) de <i>H. influenzae</i> aos antibióticos em estudo, de acordo com a cápsula e <i>breakpoints</i> do CLSI (2012).	VI
Anexo VII - Suscetibilidade aos antibióticos (CIM) das estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos, entre o período de 2009 a 2012.	VII
Anexo VIII - Suscetibilidade aos antibióticos (CIM) das estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos, entre o período de 2001 a 2008.	VIII
Anexo IX - Substituições aminoacídicas identificadas na região da transpeptidase do gene <i>ftsI</i> durante o período de 2001 a 2008 (Barbosa <i>et al.</i> , 2011).	IX

RESUMO

O *Haemophilus influenzae* (*H. Influenzae*) é uma bactéria Gram-negativa restrita ao aparelho respiratório humano, normalmente responsável por infeções respiratórias adquiridas na comunidade. A gravidade destas infeções resulta inicialmente num diagnóstico presuntivo, sendo posteriormente estabelecido um tratamento antibiótico empírico. A resistência desta bactéria aos antibióticos β -lactâmicos pode constituir sérias implicações a nível clínico, sendo que, o uso inapropriado destes antibióticos e a utilização de antibióticos de largo espectro têm contribuído grandemente para a emergência da resistência a esta classe de antibióticos. A resistência à ampicilina pode ser mediada por dois mecanismos: a produção de enzima β -lactamase, responsável pela inativação enzimática dos antibióticos β -lactâmicos, e pela presença de proteínas de ligação à penicilina alteradas que se traduz numa diminuição da afinidade aos mesmos. A amostra de 248 estirpes clínicas de *H. influenzae* foi selecionada com base na concentração inibitória mínima (CIM) à ampicilina, tendo como objetivo a caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em estirpes clínicas isoladas em Portugal. Foram estudadas 140 estirpes não produtoras de β -lactamase com CIM à ampicilina $\geq 1\text{mg/L}$, 66 estirpes produtoras de β -lactamase com CIM $\geq 8\text{mg/L}$, e ainda um grupo controlo de 42 estirpes suscetíveis com CIM $< 1\text{mg/L}$. A sequência do gene *ftsI* foi amplificada e sequenciada para todas as estirpes. Da totalidade, 204 estirpes apresentavam mutações na região da transpeptidase do gene *ftsI*, nomeadamente 136 gBLNAR de 140 estirpes BLNAR, 24 gBLNAR de 42 estirpes BLNAS e 44 gBLPACR de 66 estirpes BLPAR. Foram identificados 40 padrões mutacionais que foram incluídos em grupos e subgrupos previamente descritos (I, IIa, IIb, IIc, IID e III-like). A análise destes padrões permitiu a classificação da maioria das estirpes no grupo mutacional II (78,5%), e as substituições aminoacídicas mais frequentes situavam-se próximo do domínio KTG: Val547Ile (88,7%), Asn526Lys (76,9%) e Asn569Ser (72,6%). A relação entre as mutações identificadas e os níveis de suscetibilidade à ampicilina permitiu constatar que 8,8% das estirpes eram suscetíveis, 8,8% eram resistentes devido à produção de β -lactamase (BLPAR), 64,5% eram resistentes pela alteração das PBPs, e 17,7% apresentavam ambos os mecanismos de resistência (BLPACR). Comparando estes resultados com os resultados obtido no período 2001-2008, verificou-se um aumento do número de estirpes suscetíveis à ampicilina, e também do número de estirpes resistentes com mutações no gene *ftsI*. Pela caracterização das estirpes e relação clonal entre as estirpes BLNAR e BLPACR por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), verificou-se que as estirpes BLNAR apresentam uma grande heterogeneidade genética e que as estirpes BLPACR também não aparentam ter uma grande proximidade filogenética entre si.

Palavras-chave: *Haemophilus influenzae*; Resistência aos antibióticos; Antibióticos β -lactâmicos; Proteínas de ligação à penicilina (PBP3); Gene *ftsI*.

ABSTRACT

Haemophilus influenzae are Gram-negative bacilli restricted to the human respiratory tract and responsible for community-acquired respiratory tract infections. Due to the severity of these infections, it is standard procedure to perform a presumptive diagnostic test followed by an empirical antibiotic treatment. The developed resistance of these bacteria to the β -lactam antibiotics may constitute serious implications at the clinical level, and the inappropriate use of antibiotics or the use of broad-spectrum antibiotics has contributed greatly to the emergence of β -lactam antibiotic resistance. *H. influenzae* β -lactam antibiotic resistance develops via two mechanisms: β -lactamase production, which is responsible for the enzymatic inactivation of these antibiotics, especially β -lactams, and a change in the penicillin-binding proteins, which means decreased affinity to β -lactams. A sample of 248 clinical isolates of *H. influenzae* were selected according to their Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to Ampicillin, with the purpose of characterizing β -lactam antibiotics resistance mechanisms in clinical strains isolated in Portugal. In total, this study analyzed 140 β -lactamase-non-producing strains (BLNAR) with ampicillin MIC \geq 1mg/L, 66 β -lactamase producing strains (BLPAR) with MIC \geq 8mg/L, and a control group of 42 β -lactamase-non-producing ampicillin susceptible strains (BLNAS) with MIC $<$ 1mg/L. The *ftsI* gene encoding PBP3 was amplified and sequenced to all strains. Of the 248 *H. influenzae* strains, 204 had mutations in the *ftsI* transpeptidase domain as follows: 136 gBLNAR out of 140 BLNAR strains, 24 gBLNAR out of 42 BLNAS strains and 44 gBLPACR out of 66 BLPAR strains. Among gBLNAR and gBLPACR strains there were 40 different mutation patterns, that were included in the six previously described groups and subgroups (I, IIa, IIb, IIc, IIId, III-like). The analysis of these patterns included the majority of the strains in group II (78,5%) and the most common amino acid substitutions were located near KTG motif: Val547Ile (88,7%), Asn526Lys (76,9%) and Asn569Ser (72,6%). The relation between these mutations and ampicillin susceptibility values showed that 8,8% of these strains were susceptible, 8,8% were resistant to ampicillin due to β -lactamase producing (BLPAR), 64,5% were resistant due to changes on the PBPs (BLNAR), and 17,7% had both resistant mechanisms (BLPACR). Comparing these results with previous ones obtained between 2001 and 2008, it was possible to verify that there was a rising of the strains susceptible to ampicillin (BLNAS), as well as resistant strains (BLNAR) with mutations in the *ftsI* gene. Through *Multilocus Sequence Typing* (MLST) it was possible to characterize the strains and study the clonal relationship between BLNAR and BLPACR. The BLNAR strains have a diverse genetic heterogeneity and the BLPACR strains did not seem to present a close phylogenetic relationship between them.

Keywords: *Haemophilus influenzae*; Antibiotic resistance; Penicillin-binding proteins (PBP3); β -lactams; *ftsI* gene

1. Introdução

1.1 Perspetiva histórica

O *Haemophilus influenzae* é uma bactéria que pertence à família *Pasteurellaceae*, e ao género *Haemophilus*. As espécies constituintes do género *Haemophilus* foram primeiramente descritas por Robert Koch nos finais do século XVII, mas a descoberta da bactéria *Haemophilus influenzae* foi atribuída aos físicos e bacteriologistas Richard Pfeiffer e Shibasaburo Kitasato (Taubenberger *et al.*, 2007).

Durante o período de 1889 e 1892, Pfeiffer analisou amostras de secreções brônquicas de indivíduos que faleceram durante a pandemia da gripe, e detetou nas mesmas, a existência de um grande número de pequenos bacilos que tinham a particularidade de necessitar de um meio enriquecido em sangue para o seu crescimento. Richard Pfeiffer designou estes organismos por "*Bacillus influenzae*", e considerou-os, nessa altura, como os agentes primários causadores da doença da gripe.

Em 1920, foi sugerida a alteração do seu nome para *Haemophilus influenzae* (proveniente da palavra grega *haemophilus*, de significado "adorador de sangue"), por Winslow e os seus colaboradores (1917), uma vez que este refletia os requisitos nutricionais específicos da espécie e da sua aparente (mas errónea) associação com a pandemia da gripe. Na década de 1930, Pittman (1931) definiu os dois maiores grupos de *Haemophilus influenzae*, o grupo das estirpes capsuladas e o das não-capsuladas. Em 1932, foi atribuído o nome de *Haemophilus influenzae* pelo Comité de Nomenclatura da Associação Americana de Bacteriologistas.

Em 1933, o vírus humano da gripe foi descoberto e identificado como o agente etiológico da gripe, colocando em causa a importância do *H. influenzae* na pandemia de 1892. No entanto, verificou-se que este poderá ter contribuído grandemente para a elevada taxa de mortalidade durante a pandemia, exatamente pelo fato de estar associada a infeções bacterianas secundárias (Taubenberger *et al.*, 2007).

1.2 Género *Haemophilus*

As espécies do género *Haemophilus* caracterizam-se por pequenos bacilos ou cocobacilos Gram-negativos (**Figura 1**), imóveis, pleomórficos, aeróbios (com uma pressão atmosférica de 5% de CO₂, e uma temperatura ideal de crescimento entre os 35°C e os 37°C), mas com a capacidade de crescer facultativamente em meios anaeróbios. O crescimento aeróbio *in vitro* depende da presença de dois fatores, o fator X e o fator V. O fator X corresponde à

hematina, necessária para a síntese do citocromo c e outras enzimas respiratórias, e o fator V, corresponde à nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é essencial nos processos de oxidação-redução do metabolismo celular da bactéria (Javier-Zepeda, 1999; Tristram *et al.*, 2007).

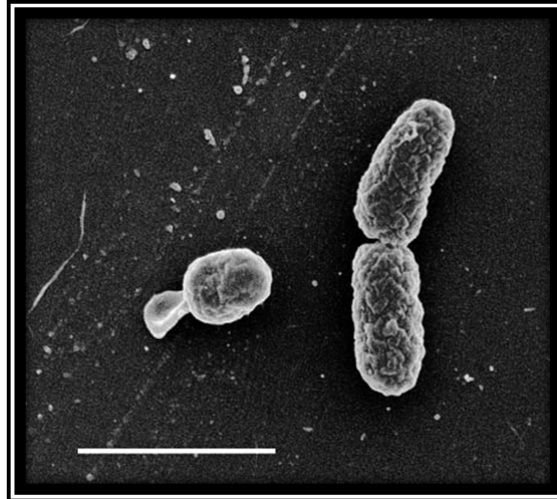


Figura 1 - *Haemophilus influenzae*
(<http://recommendpills.com/haemophilus-influenzae-symptoms/16/09/2012/>)

A parede celular de *H. influenzae* apresenta uma estrutura típica das bactérias Gram-negativas, sendo constituída por uma camada de peptidoglicano e por três outros componentes que a envolvem externamente: lipoproteínas (que têm a função de estabilizar a membrana externa), a membrana externa e lipopolissacarídeos (LPS), que funcionam como endotoxinas e caracterizam-se por apresentar cadeias polissacarídeas curtas designadas por lipooligossacarídeos. Esta última característica é considerada um dos fatores de virulência da espécie, e é específico para a estirpe (Rahman, 2008).

H. influenzae foi o primeiro organismo de vida livre que teve o seu genoma totalmente sequenciado, sendo este constituído por 1.830.140 pares de base de DNA num cromossoma circular que apresenta 1740 genes codificantes de proteínas, 58 tRNA e outros 18 genes RNA (Fleishmann *et al.*, 1995). A sequenciação do genoma permitiu que se aprofundassem conhecimentos científicos ao nível do metabolismo bacteriano, adaptação ao hospedeiro e virulência da bactéria.

É um organismo que está presente normalmente na flora bacteriana do trato respiratório superior do Homem, especialmente na orofaringe e nasofaringe (aproximadamente 75% de indivíduos saudáveis). São agentes patogénicos oportunistas que estão perfeitamente adaptados ao hospedeiro humano, e que apenas causa infeção ou doença, quando o sistema imunitário está debilitado ou pela presença de infeções virais (Rahman, 2008).

1.3 Patogénese

Existem dois tipos de infecções associadas a *H. influenzae*, as invasivas e as não invasivas, que se distinguem pelos seus perfis epidemiológicos. Entre as infecções invasivas mais comuns, destacam-se a meningite e a septicemia. A pneumonia, pericardite, bacteriemia, epiglote, celulite e artrite séptica (Ulanova, 2013) são também consideradas como doenças invasivas. As infecções das mucosas como a sinusite, otite média, bronquite e conjuntivite estão incluídas nas doenças consideradas não invasivas (Javier-Zepeda, 1999; Gomez-de-Leon *et al.*, 2000; CDC/NCIRD, 2012; Nizet *et al.* 1996).

Algumas das estirpes *H. influenzae* podem apresentar uma cápsula polissacarídea, que as tornam menos vulneráveis aos mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, protegendo-as assim contra a fagocitose ao impedir a fixação de anticorpos e a lise bacteriana. A estrutura da cápsula apresenta uma característica intrínseca, nomeadamente uma baixa atividade antigénica, uma vez que não ativa a resposta imune via complemento, favorece a invasão do sangue ou do fluido cefalorraquidiano sem agravar a resposta inflamatória, permitindo a disseminação microbiana (Smith-Vaughan *et al.*, 1998; Nizet *et al.*, 1996; Rahman, 2008).

Com base nas suas propriedades antigénicas e químicas, a cápsula pode ser classificada serologicamente em 6 serótipos capsulares (a, b, c, d, e, f) (Pittman, 1931; Satola *et al.*, 2003). Estes podem ser identificados por métodos serológicos, ou seja, por testes de aglutinação por meio de antissoros específicos para cada serótipo capsular, e/ou por técnicas moleculares, isto é, a deteção do gene específico para cada tipo capsular é por *Polymerase Chain Reaction* (Falla *et al.*, 1994).

A produção da cápsula é codificada por um complexo de genes, designado por locus *cap*, que corresponde a um fragmento de 17Kb do cromossoma. A região central do locus é específica para cada serótipo, sendo que as estirpes dos serótipos a – f possuem uma cópia do locus *cap*, com exceção do serótipo b, que possui uma duplicação do *cap*, com duas cópias separadas entre si e ligadas a elementos de inserção (IS1016). O locus *cap* tem uma organização comum para os seis serótipos capsulares, e é formado pelas regiões I II e III. As regiões I e III contêm os genes necessários para o processamento e exportação dos polissacarídeos presentes na superfície celular, sendo o gene *bexA* comum a todos os serótipos. A região II é específica para cada um dos serótipos e está situada entre a região I e III (Falla *et al.* 1994; Kostyanov & Sechanova, 2012; Satola *et al.* 2007).

A cápsula do tipo b (Hib), responsável pela grande maioria das infecções invasivas, é constituída por polímeros repetidos de ribosil e ribitol-fosfato, designando-se por polirribosil-ribitol-fosfato (PRP), que é determinante na virulência da bactéria, uma vez que permite a sua sobrevivência a nível intravascular (Rahman, 2008; Roberts *et al.*, 1981). No que diz respeito à patogenicidade, o Hib apresenta uma sobreprodução do material

capsular, de propriedade hidrofílica, que determina uma maior resistência à dissecação, favorecendo a transmissão entre indivíduos, e aumentando também a inibição da fagocitose e colonização do epitélio, contribuindo assim para as altas prevalências deste tipo capsular em doenças invasivas (Kroll & Moxon, 1988).

A cápsula dos outros serótipos (a, c, d, e, f) distingue-se estruturalmente da cápsula do tipo b pela sua constituição polissacarídea (substituição de uma pentose por uma hexose), e pela sua constituição lipopolissacárida, que poderá contribuir para a patogenicidade diferencial dos vários serótipos. Em estudos realizados em ratinhos, verificou-se também que os serótipos a, c e f apresentam uma maior virulência quando comparados com os serótipos d ou e (Zwahlen *et al.*, 1983, Meats *et al.*, 2003).

As estirpes que não produzem cápsula são designadas por não capsuladas ou não tipáveis (HiNC), podem apresentar uma grande variedade de proteínas na superfície celular e fímbrias que auxiliam na adesão às mucosas ou células do trato respiratório do hospedeiro, facilitando desta forma a colonização do trato respiratório superior, e, numa fase mais avançada, a invasão do trato respiratório inferior, causando danos nos cílios pulmonares. Apresentam uma grande diversidade genética quando comparada com as estirpes capsuladas (Gomez-de-Leon *et al.*, 2000; Meats *et al.*, 2003; Musser *et al.*, 1986; Javier-Zepeda, 1999), e a grande maioria é responsável pelas infeções não invasivas, causando raramente bacteriemia ou meningite (Nizet *et al.*, 1996; Kaur *et al.*, 2011) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Espectro clínico de infeções causadas por *Haemophilus influenzae* (Slack, 2007)

Tipo de Infeção	Grupo de Idades	Estirpes
Invasiva	90% Crianças (<4 anos)	90% <i>H. influenzae</i> do tipo b
		10% estirpes HiNC
		1% <i>H. influenzae</i> do tipo e, f
Neonatal e maternal	Recém-nascidos, grávidas e parturiente	>90% estirpes HiNC
Não Invasiva	Crianças e adultos	>90% estirpes HiNC

Um outro fator que determina a virulência destas bactérias, é a sua capacidade de incorporar o ácido siálico nas porções terminais dos lipoligossacarídeos (LOS) da membrana externa, como a lactose, a *N*-acetillactosamina e possivelmente a *N*-acetil-galactosamina, permitindo desta forma a evasão à opsonização e fagocitose, pela sua capacidade de reproduzir estruturas moleculares usualmente encontradas nos hospedeiros (Rahman, 2008).

O Haemophilus influenzae possui ainda uma lipoproteína de superfície de 42kDa, a Proteína D (PD), altamente conservada em estirpes capsuladas e não capsuladas. Esta proteína está

envolvida na patogénese de infeções do trato respiratório, danificando a função ciliar no tecido humano da nasofaringe. A sua atividade glicerofosforodiesterase indica que a PD é um fator de virulência que leva à libertação de fosforocolina das células epiteliais do hospedeiro (Rahman, 2008).

1.4 Vacina contra *Haemophilus influenzae* do tipo b (Hib)

Antes da introdução da vacina, o *H. influenzae* do tipo b era considerado o responsável por cerca de três milhões de casos de infeções graves, com uma estimativa de 386.000 mortes por ano, devido a infeções como a meningite e pneumonia, sendo as vítimas essencialmente crianças com idades inferiores a 5 anos (Tristram *et al.*, 2007).

A primeira vacina Hib foi licenciada e comercializada nos Estados Unidos da América em 1985, e esta era puramente polissacarídea. A resposta a esta vacina era altamente dependente da idade, capaz de conferir proteção a 90% das crianças vacinadas com 18 a 71 meses de idade, mas em crianças de idade inferior ou igual a 18 meses detetou-se uma resposta imunitária muito fraca, em que os anticorpos apresentavam uma atividade funcional muito reduzida.

Em 1987 surge uma nova vacina, a primeira vacina Hib conjugada polissacarídea – proteica (PRP-D, ProHIBIT), que consiste na união de um polissacárido (PRP) com uma proteína transportadora, podendo esta ser constituída pela toxina do tétano ou da difteria, ou ainda pelo complexo proteico da membrana externa de *Neisseria meningitidis* (Ulanova & Tsang, 2009). A vacina teve um grande impacto na capacidade de resposta imunitária e a produção de anticorpos.

Existem atualmente três tipos de vacinas conjugadas, sendo que, as duas primeiras são administradas em crianças de idades iguais a 6 semanas, e a terceira, a crianças com 12 ou mais meses de idade. Todas elas utilizam o mesmo princípio imunogénico, variando no tipo de proteína transportadora, método de conjugação química e dimensão polissacarídica. Estas vacinas têm demonstrado uma grande eficácia a nível global contra manifestações de infeção invasiva Hib, com uma estimativa de eficácia clínica de 95-100% (CDC/NCIRD, 2012).

A vacina Hib foi introduzida e licenciada em Portugal em 1994, primeiramente numa base voluntária, sendo depois efetivamente incluída no Programa Nacional de Vacinação (PNV) no ano 2000.

Antes da introdução da vacina contra o *H. influenzae*, a maioria das infecções invasivas eram causadas por Hib, e afetavam na sua maioria crianças com menos de 10 anos de idade. Com a introdução das vacinas conjugadas, a incidência das infecções por Hib diminuiu drasticamente e significativamente (2 a 3 casos por 100.000 crianças de inferior a 5 anos) nos países onde a vacina foi implementada e integrada no PNV (**Figura 2**) (Ladhani *et al.*, 2010).

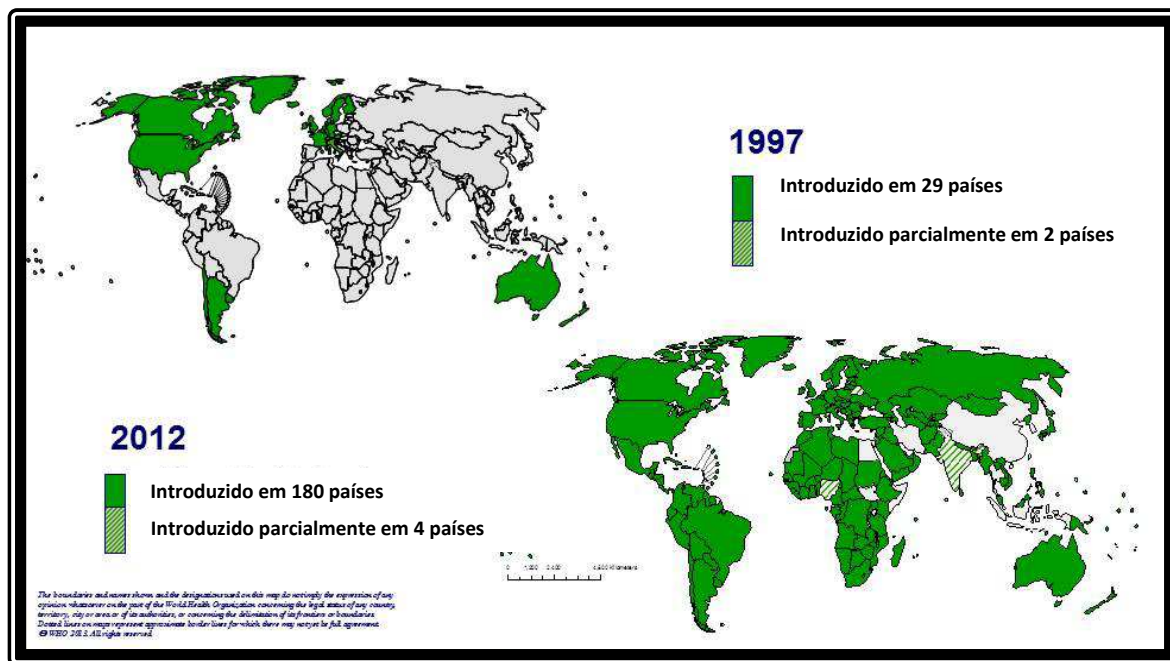


Figura 2 - Países onde a vacina contra o Hib foi introduzida, entre 1997 e 2012 (WHO, 2013).

Atualmente, a maioria das doenças invasivas provocadas por *H. influenzae* são causadas por estirpes HiNC e de serótipo não-b, particularmente a e f, cuja prevalência aumentou consideravelmente a nível global, e o seu número tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Ainda a salientar que a idade dos pacientes que sofrem de doença invasiva, também sofreu alterações com esta mudança, de crianças (com menos de 12 anos) e adultos, para recém-nascidos e idosos com mais de 65 anos de idade (Ladhani *et al.*, 2010; Ulanova, 2013; Ulanova & Tsang, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças invasivas como pneumonia e meningite causadas pelo Hib em crianças jovens, ainda são um problema de saúde pública em diversas partes do mundo onde a vacinação não foi implementada em grande escala. A maioria dos casos de morbidade e mortalidade ocorrem nos países em vias de desenvolvimento. (WHO, 2013).

1.5 Antibióticos

Os antibióticos são substâncias químicas que podem provocar a morte ou inibir o crescimento dos microrganismos, podendo estas serem produzidas pelo próprio microrganismo ou ser de origem sintética. Embora existam várias classificações para os antibióticos que se baseiam no espectro bacteriano, tipo de atividade e mecanismo de ação, a mais utilizada é baseada na sua estrutura química. As classes principais de antibióticos são:

- β -lactâmicos (i.e. penicilina, cefalosporinas, carbapenemes);
- Aminoglicosídeos (i.e. gentamicina, estreptomicina);
- Quinolonas (i.e. ciprofloxacina);
- Tetraciclina (i.e. tetraciclina);
- Macrolídeos (i.e. eritromicina, azitromicina);
- Glicopéptidos (i.e. vancomicina);
- Sulfonamidas (i.e. trimetoprim-sulfametoxazol);
- Lincosamidas (i.e. clindamicina)
- Oxazolidionas (i.e. linezolid).

Existem outros antibióticos que não se incluem em nenhuma destas categorias como é o caso da rifampicina e o cloranfenicol.

Embora a terapêutica com antibióticos seja de grande utilidade nas infeções por *H. influenzae*, a sua eficácia fica comprometida com a deteção de novos mecanismos de resistência e concomitante emergência de estirpes resistentes. Os antibióticos atuam seletivamente nas funções vitais do microrganismo, sem afetar (ou podendo apresentar efeitos mínimos) as funções do hospedeiro.

Estes podem ser categorizados de acordo com a estrutura da bactéria, e a função que é afetada quando submetida à ação dos antibióticos (**Figura 3**), sendo eles:

- Inibidores da síntese da parede celular (i.e. β -lactâmicos, glicopéptidos);
- Inibidores da síntese de proteínas (i.e. aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol);
- Inibidores da função da membrana celular;
- Inibidores do metabolismo de ácido fólico (i.e. sulfanamidas, SXT);
- Inibidores da síntese de ácidos nucleicos (i.e. quinolonas).

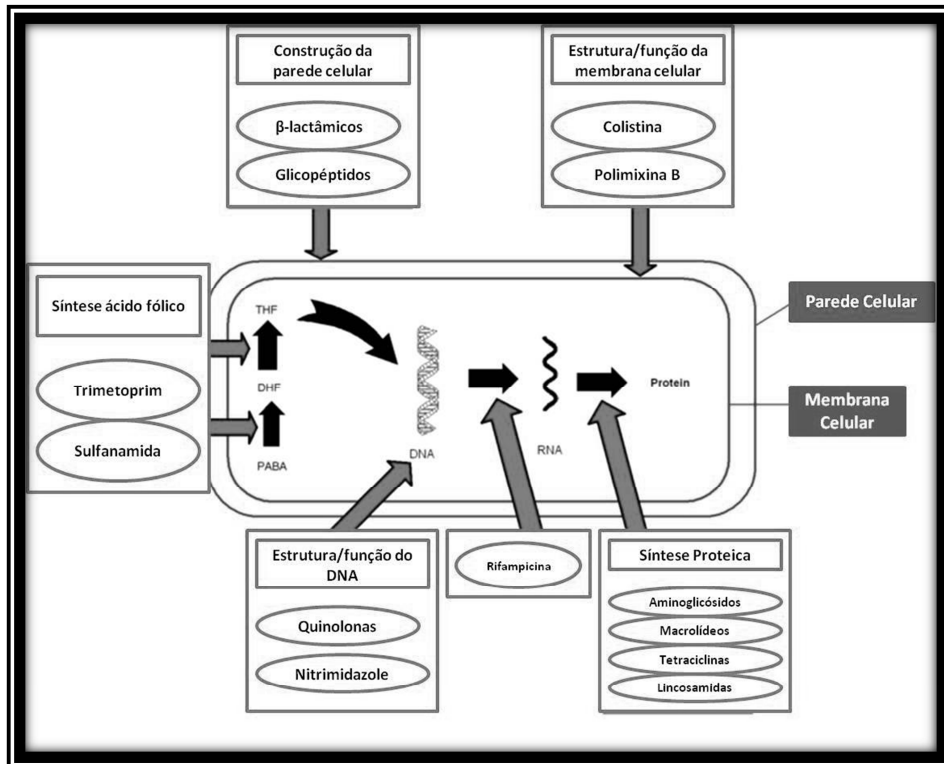


Figura 3 - Mecanismos de ação dos antibióticos

(<http://www.binujohn.name/2010/08/16/antibiotics/antibiotic-mechanism-of-action/>)

1.5.1 β-lactâmicos

A classe dos β-lactâmicos apresenta uma grande variedade de antibióticos que são largamente utilizados na terapêutica de *H. influenzae*. Estes têm em comum a existência de um anel β-lactâmico na sua estrutura molecular central, mas classificam-se de forma diferente de acordo com a estrutura química do anel central, sendo assim os monobactâmicos caracterizados pela existência de um único anel β-lactâmico, as penicilinas e os carbapenemes pela fusão do anel β-lactâmico a um anel tiazolidina e as cefalosporinas pela fusão do anel β-lactâmico a um anel di-hidrotiazina (Hamilton-Miller, 1999).

Os antibióticos β-lactâmicos são bactericidas, ou seja, o seu efeito bactericida resulta da ativação de enzimas autolíticas, e atuam quando a bactéria está em fase exponencial de crescimento. A presença do anel β-lactâmico na sua estrutura é muito importante, uma vez que provoca a inativação das transpeptidases (também designadas por proteínas de ligação à penicilina – PBPs), que catalisam as reações finais da síntese de petidoglicano da parede celular da bactéria (Byarugaba, 2010). Os antibióticos β-lactâmicos diferenciam-se pelo seu espectro de atividade, pelo seu efeito antimicrobiano, pela sua toxicidade, estabilidade no

corpo humano, capacidade de transpor a barreira sangue-cérebro e pela sua suscetibilidade às β -lactamases.

As proteínas de ligação à penicilina, as PBPs, são enzimas que estão envolvidas na síntese do peptidoglicano, e estas podem ser diferenciadas em transpeptidases, carboxipeptidases ou glicosiltransferases. Os antibióticos β -lactâmicos quando em contato com as PBPs, formam complexos estáveis mas irreversíveis, produzindo um desequilíbrio no metabolismo da parede celular, resultando numa inibição do crescimento ou lise celular (Zapun *et al.*, 2007).

O peptidoglicano é uma macromolécula constituída por cadeias polissacarídicas lineares alternadas de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e N-acetil murâmico (MurNAc) e outros aminoácidos. As duas cadeias estão ligadas entre si por ligações peptídicas (entre os aminoácidos) e ligações glicosídicas (entre as hexoses). O peptidoglicano é uma estrutura que confere rigidez à parede celular das bactérias, determina a forma da bactéria, previne a lise osmótica e funciona como local de ligação de fatores de virulência (Schleifer & Kandler, 1972).

A camada de peptidoglicano constitui cerca de 90% da parede celular nas estirpes Gram-positivas, sendo substancialmente mais espessa e em multicamada. As Gram-negativas apresentam uma camada fina de peptidoglicano (5-20% da parede celular), e para além da membrana plasmática, são constituídas por uma bicamada fosfolipídica exterior à camada de peptidoglicano, designada por membrana externa (Silhavy *et al.*, 2010; Schleifer & Kandler, 1972).

As unidades individuais de peptidoglicano são produzidas no interior da célula da bactéria, mas o “*cross-linking*” final é catalisado no exterior da membrana citoplasmática por um grupo de enzimas ancoradas na membrana, designadas por transpeptidases da parede celular. Nesta reação de “*cross-linking*”, é formada uma ligação peptídica entre o penúltimo resíduo de D-alanina de uma cadeia e o aminoácido terminal do ácido diamino-pimélico da outra cadeia. A ligação é formada com o penúltimo resíduo de D-alanina, causando a clivagem da região terminal D-alanina (Wilke *et al.*, 2005). Os antibióticos β -lactâmicos têm a capacidade de imitar o dipéptido D-Ala D-Ala, atuando como inibidores de β -lactamases, e competindo assim pelo centro ativo das PBPs, inibindo desta forma o cruzamento final da síntese do peptidoglicano (Zapun *et al.*, 2008).

1.5.1.1 Penicilinas

A penicilina natural é produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. A atividade fermentativa de estirpes mutantes e em combinação com meios e métodos de cultura melhorados e específicos, permitiu que se obtivesse uma produção em massa de penicilina até surgirem as penicilinas semi-sintéticas (Murray *et al.*, 2002).

As aminopenicilinas, onde se inclui a ampicilina (**Figura 4**) e a amoxicilina, são penicilinas semi-sintéticas de largo espectro, e diferem da penicilina pela presença de um grupo amino. Este fato permite que os antibióticos penetrem com maior facilidade na membrana externa das bactérias Gram-negativas, apresentem uma maior resistência às penicilinases, e sejam mais eficazes quando administradas oralmente. A ampicilina atua como um inibidor competitivo da enzima transpeptidase, onde se acopla à proteína presente na membrana interna da bactéria (PBPs), inibindo a síntese de peptidoglicano da parede celular, causando lise celular (Russel & Chopra, 1990).

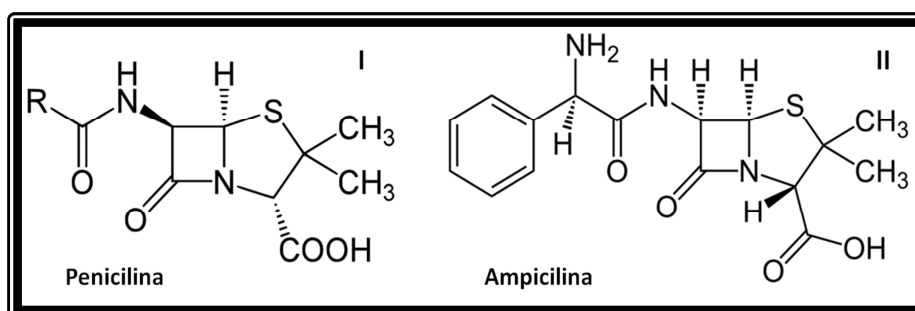


Figura 4 - Estrutura química geral da penicilina (em que “R” é o grupo variável) e da ampicilina (<http://en.wikipedia.org/>)

1.5.1.2 Cefalosporinas

A estrutura química das cefalosporinas é muito semelhante à da penicilina, com um anel β -lactâmico e um anel tiazolidina, mas com uma cadeia lateral variável. Apresentam um maior espectro de ação quando comparadas com as penicilinas, menor toxicidade e são menos suscetíveis às β -lactamases. A estrutura das cefalosporinas é modificada de acordo com a posição 3 ou 7 do anel β -lactâmico, alterando desta forma o perfil farmacológico e o tipo de atividade antimicrobiano, respetivamente (**Figura 5**).

Atualmente dividem-se em quatro “gerações”, de acordo com as suas propriedades antimicrobianas, e cada geração apresenta um espectro de ação mais largo que a outra anterior. Os antibióticos de 1ª e 2ª (cefaclor, cefuroxima) geração apresentam alguma suscetibilidade às β -lactamases, e um período de semivida curto. As cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima) apresentam um período de vida mais longo que as anteriores, um largo espectro de ação e uma maior atividade contra as bactérias Gram-negativas. As de 4ª geração (cefepima) têm uma maior capacidade de penetração da membrana externa das bactérias Gram-negativas, tal como uma maior resistência às β -lactamases.

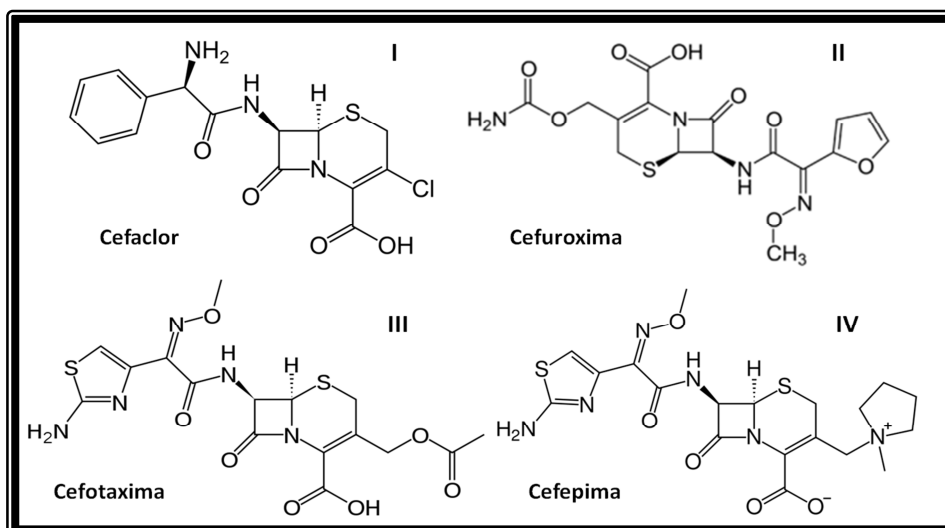


Figura 5 - Estrutura química de algumas cefalosporinas. I e II – Cefalosporinas de 2ª geração; III – Cefalosporina de 3ª geração; IV – Cefalosporina de 4ª geração (<http://en.wikipedia.org/>).

1.5.1.3 Carbapenemes

Os carbapenemes são dos antibióticos β -lactâmicos, os que apresentam maior espectro de ação, exatamente pelo fato de apresentarem uma estrutura que lhes confere um elevado grau de resistência às β -lactamases e uma maior atividade antimicrobiana, tanto contra as bactérias Gram-positivas como as Gram-negativas. No que diz respeito à sua estrutura química, esta é muito semelhante à da penicilina, diferindo no átomo de enxofre na posição 1 por um átomo de carbono, e na introdução de uma insaturação na cadeia, daí o nome do grupo (**Figura 6**).

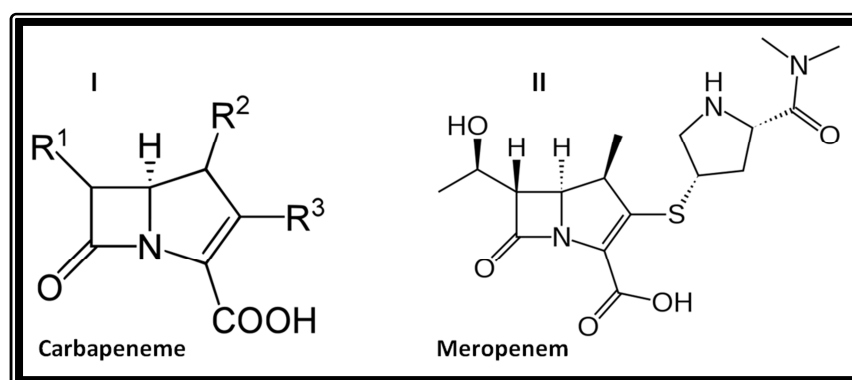


Figura 6 - Estrutura química geral do Carpanem (I) e do Meropenem (II) (<http://en.wikipedia.org/>).

1.5.1.4 Inibidores de β -lactamases

Os inibidores de β -lactamases apresentam na sua estrutura química um anel β -lactâmico, apresentam na generalidade uma fraca atividade antimicrobiana, mas com uma afinidade forte para com as β -lactamases. Quando combinados com os antibióticos β -lactâmicos, têm como função a inativação permanente das β -lactamases no espaço periplasmático, facilitando desta forma o contato do antibiótico com o seu alvo, as proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Estes compostos são designados de “inibidores suicidas” uma vez que se ligam irreversivelmente ao centro ativo das enzimas, são modificados por estas, e formam um complexo estável, mas irreversível, entre a enzima e o inibidor (Drawz & Bonomo, 2010). A combinação de um inibidor com um antibiótico β -lactâmico intensifica a eficácia terapêutica do anterior, e um exemplo disso é o co-amoxiclave, resultante da combinação entre a penicilina, a amoxicilina e o inibidor de β -lactamase, o ácido clavulânico. Esta combinação resulta num antibiótico com um largo espectro de ação e com uma grande eficácia contra bactérias resistentes à amoxicilina, que produzam β -lactamases.

1.6 Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos

O *H. influenzae* é um agente patogénico humano responsável por infeções respiratórias adquiridas na comunidade e infeções invasivas. O aumento da prevalência de fenótipos de resistência, limita por si a escolha adequada do tratamento antimicrobiano a ser concretizado. Daí serem necessários estudos de vigilância, para que possam ser determinadas tendências e padrões de suscetibilidade locais, nacionais e internacionais, em que efetivamente é estabelecido um tratamento antibiótico empírico (Garcia-Cobos *et al.*, 2008). A resistência desta bactéria aos antibióticos beta-lactâmicos pode constituir sérias implicações a nível clínico, sendo que, o uso inapropriado dos antibióticos e a utilização de antibióticos de largo espectro tem contribuído grandemente para a emergência da resistência aos antibióticos (Bae *et al.*, 2010).

A resistência aos β -lactâmicos pode envolver a hidrólise dos antibióticos pelas β -lactamases, a modificação das proteínas de ligação à penicilina (PBPs), a presença de bombas de efluxo no espaço periplasmático ou por alterações na permeabilidade da membrana celular. No caso do *H. influenzae*, a membrana externa é bastante permeável à entrada dos antibióticos β -lactâmicos, e a resistência à ampicilina e β -lactâmicos deve-se essencialmente à produção de β -lactamases e/ou pela presença de PBPs modificados (Gutmann *et al.*, 1988). Existem no entanto estirpes que podem apresentar os dois tipos de mecanismos.

As β -lactamases podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas, ou no espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas (Bush, 1988). Através do processo de hidrólise, é quebrada a estrutura do anel β -lactâmico, desativando as propriedades

antimicrobianas do antibiótico. Os genes que codificam a produção destas enzimas podem estar localizados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos. As de origem plasmídica são variáveis, permitindo que haja transferência de elementos entre espécies, e que haja posteriormente incorporação da informação genética no cromossoma bacteriano (Bush, 1988; Tristram *et al.*, 2007).

As β -lactamases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que se classificam de acordo com o seu espectro hidrolítico, suscetibilidade aos inibidores, localização genética (plasmídea ou cromossômica) ou ainda pela sua sequência genética ou aminoacídica. As mais comuns incluem as penicilinases, cefalosporinases, metalo- β -lactamases, as carbapenemases e as β -lactamases de largo espectro (ESBL's).

As proteínas de ligação à penicilina quando modificadas conformacionalmente devido às substituições de aminoácidos, reduzem a afinidade dos antibióticos β -lactâmicos (Sanbongi *et al.*, 2006).

1.7 Mecanismo de resistência enzimático em *Haemophilus influenzae*

O mecanismo de resistência à ampicilina mediado por β -lactamases é uma das formas de resistência mais comum utilizado pelas bactérias, tendo sido detetado pela primeira vez em 1974 (Gutmann *et al.*, 1988). As estirpes que apresentam este tipo de mecanismo designam-se por estirpes β -lactamase positivas resistentes à ampicilina (BLPAR). Várias β -lactamases de origem plasmídica são produzidas por organismos Gram-negativos, porém a enzima TEM-1 é a mais comum em *H. influenzae* (Gutmann *et al.*, 1988; Tristram *et al.*, 2007).

Existem dois grupos distintos de plasmídeos TEM-específicos em *H. influenzae*, nomeadamente plasmídeos pequenos (< 10 Kb), não conjugativos, que transportam normalmente o gene bla_{TEM} como o único determinante de resistência, e um plasmídeo de maior peso molecular (~40 Kb), que geralmente transporta outros genes de resistência, como os da resistência ao cloranfenicol ou da tetraciclina. Os plasmídeos maiores são mais comuns, e aparentam ser mais importantes na disseminação dos genes bla_{TEM} em *H. influenzae* (Tristram *et al.*, 2007).

Em 1981, foi descoberta e isolada uma nova β -lactamase em *H. influenzae*, proveniente de um isolado clínico Hib resistente à ampicilina, à qual designaram por ROB-1, sendo este de menor prevalência que o TEM-1. O TEM-1 e o ROB-1 partilham de forma limitada uma homologia de sequência de aminoácidos, mas apresentam um perfil de substrato e uma taxa de hidrólise de ampicilina bastante idênticos (Karlowsky *et al.*, 2000). Em algumas estirpes, verifica-se a produção de diferentes enzimas, mas já foram identificadas estirpes, ainda que raramente, que produzem mais do que um tipo de enzima (Farrell *et al.*, 2005).

A β -lactamase TEM-1 é uma enzima muito comum nas bactérias Gram-negativas, de largo espectro, e tem sido considerada uma enzima totalmente eficiente (Bush *et al.*, 1995). Hidrolisa a penicilina e os derivados de penicilina, tais como ampicilina, carbenicilina e piperacilina. É também bastante ativa contra a cefuroxima, porém apresenta atividade insignificante contra cefotaxima, ceftazidima ou ceftriaxona. O TEM-1 possui um isótopo menos comum, designado por TEM-2, e é uma enzima com propriedades cinéticas idênticas, porém com a diferença de um único aminoácido, na posição 37, de uma glutamina para uma lisina, que muda o ponto isoelétrico da proteína de 5,4 (TEM-1) a 5,6 (TEM-2) (Tristram *et al.*, 2007).

As β -lactamases podem ser classificadas segundo a sua sequência homóloga de aminoácidos pela escala de Ambler (classe A a D), ou pelas suas características funcionais e bioquímicas pela escala de Bush-Jacoby-Medeiros (grupo I a IV). As enzimas TEM-1, TEM-2 e ROB-1 pertencem à classe A da escala de Ambler e à classe 2b da escala de Bush-Jacoby-Medeiros (Drawz & Bonomo, 2010).

As enzimas TEM-1 e TEM-2 são codificadas pelo gene bla_{TEM} , sendo conhecidas por serem transponíveis, em que o gene bla_{TEM-2} está associado ao transposo 1 (Tn1), e o gene bla_{TEM-1} está associado a uma série de transposões, que inclui o Tn2 e o Tn3 (Tristram *et al.*, 2007).

Na maioria dos isolados, o gene bla_{ROB-1} está localizado em pequenos plasmídeos que variam entre 4,1 a 5,0 Kb. A sequência nucleotídica do gene e a sua sequência aminoacídica indicam que é uma enzima de classe A, mas no entanto apresenta uma maior aproximação com as β -lactamases das bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas (Tristram *et al.*, 2007).

Existem estudos que descrevem uma associação distinta entre a presença de ROB-1 e uma elevada concentração inibitória mínima (CIM) ao cefaclor em *H. influenzae*, havendo explicações para este fato, nomeadamente, mutações nos genes bla_{ROB-1} ou bla_{TEM-1} , β -lactamases com atividade antimicrobiana aumentada contra o cefaclor e alterações nas PBPs que podem intensificar a ação da β -lactamase, especialmente a ROB-1 (Farrell *et al.*, 2005; Karlowsky *et al.*, 2000; Tristram *et al.*, 2010).

1.8 Mecanismo de resistência não enzimático em *Haemophilus influenzae*

O mecanismo de resistência não enzimático aos antibióticos β -lactâmicos em *H. influenzae* está associado a alterações nas PBP3A e PBP3B (Parr & Bryan, 1984; Tristram *et al.*, 2007). As proteínas de ligação à penicilina estão presentes em quase todas as bactérias, podem variar de espécie para espécie no seu número, dimensão, quantidade e afinidade para com o antibiótico β -lactâmico, e estão localizados de forma não aleatória na região exterior da membrana citoplasmática (Georgopapadakou, 1993). O *H. influenzae* apresenta oito PBPs,

que se designam por PBPs 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 e 6, e as suas capacidades de ligação aos diferentes β -lactâmicos são muito semelhantes às PBPs em *E. coli*. (Tristram *et al.*, 2007).

A PBP3 é uma proteína relativamente grande com 610 resíduos aminoacídicos, e é codificada pelo gene *ftsI*. É constituída por um domínio citoplasmático, um segmento transmembranar e um domínio periplasmático, que apresenta atividade de transpeptidase e está envolvido na síntese de peptidoglicano do septo da célula em divisão (Tristram *et al.*, 2007). A maioria das enzimas de ligação à penicilina, incluindo as PBP3, possui três domínios aminoacídicos bem conservados, que são essenciais para a sua função. Nas PBP3, estes domínios são S327-T-V-K, S379-S-N e K513-T-G (Tristram *et al.*, 2007).

A resistência à ampicilina em estirpes não produtoras de β -lactamase (BLNAR) em *H. influenzae* foi descrita pela primeira vez em 1974 por Thornsberry e Kirven. Em 1980, Markowitz reportou a existência de um isolado clínico Hib resistente à ampicilina de um caso de endocardite e meningite, em que não foi detetada a presença de β -lactamases, mas propôs que a alteração do centro ativo poderia ser uma justificação plausível (Tristram *et al.*, 2007). Em 1984, Parr e Bryan utilizaram DNA genómico de uma estirpe Hib, BLNAR, para transformar uma estirpe suscetível (BLNAS) numa estirpe de fenótipo BLNAR, e com isso, demonstraram a diminuição de afinidade das PBP3A e PBP3B para com os antibióticos β -lactâmicos, tanto na estirpe dadora como na estirpe transformada (Parr & Bryan, 1984).

Segundo os *breakpoints* do CLSI (2009), fenotipicamente, as estirpes BLNAR são definidas pela ausência de β -lactamase e apresentam uma concentração mínima inibitória (CIM) à ampicilina superior ou igual a 4 mg/L, sendo assim consideradas resistentes. No entanto, existem alguns autores que também incluem nesta definição, estirpes resistentes à ampicilina com um CIM superior ou igual a 2 mg/L (Ubukata *et al.*, 2001; Garcia-Cobos *et al.*, 2008) ou inferior ou igual a 1 mg/L (Garcia-Cobos *et al.*, 2008). Os *breakpoints* atualmente recomendados para a ampicilina, poderão estar a interferir com a deteção laboratorial de um número considerável de isolados BLNAR, tendo consequências significativas a nível epidemiológico e clínico, como se tem vindo a verificar pelo aumento da sua incidência em várias regiões do mundo (Sanbongi *et al.*, 2006; Fluit *et al.*, 2005).

As estirpes BLNAR apresentam não só uma reduzida suscetibilidade à ampicilina, como também a outros β -lactâmicos, particularmente às cefalosporinas (Ubukata *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2006; Tristram *et al.*, 2007). Existem autores que sugerem outros antibióticos como melhores indicadores de identificação de estirpes BLNAR, nomeadamente o cefaclor e a cefuroxima. Atualmente é recomendado que as estirpes BLNAR sejam consideradas resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico, ao cefaclor e cefuroxima, apesar da aparente suscetibilidade *in vitro* de algumas estirpes para com estes antibióticos (Tristram *et al.*, 2007).

As estirpes BLNAR podem ser definidas genotipicamente (gBLNAR) de acordo com a sequenciação do gene *ftsI* e pelas substituições aminoacídicas da região da transpeptidase

das PBP3, particularmente pelas que estão perto dos domínios conservados KTG, STVK e SSN. Diversos estudos demonstraram que as substituições que têm sido descritas em associação com o fenótipo BLNAR podem atingir os 24 aminoácidos diferentes na região da transpeptidases das PBP3. Embora as estirpes consideradas nestes estudos tenham sido isoladas entre os anos de 1988 e 2004, e sejam de origens geográficas distintas, as substituições existentes são consistentes entre estudos, em que apenas substituições específicas em certas posições estão associadas à resistência. Não existe uma substituição aminoacídica que seja comum a todas as estirpes BLNAR, mas existem substituições que ocorrem com grande frequência, nomeadamente, Asn526Lys, Arg517His, Met377Ile, Ser357Asn e Asp350Asn. Uma única estirpe BLNAR pode apresentar desde uma até 11 substituições diferentes (Tristram *et al.*, 2007).

Ubukata *et al.* (2001) classificou os isolados BLNAR em 3 grupos mutacionais (I, II, III), de acordo com a presença de substituições aminoacídicas chave nas PBP3, em que o grupo I é caracterizado pela mutação Arg517His, o grupo II pela presença da mutação Asn526Lys, e o grupo III é caracterizado pela presença simultânea de três mutações, nomeadamente Met377Ile, Ser385Thr e Leu389Phe. Esta classificação foi parcialmente modificada por Dabernat *et al.* (2002) no que diz respeito ao grupo II, em que este subdividiu o mesmo em 4 grupos (IIa, IIb, IIc e IId), e onde considerou substituições adicionais além da substituição Asn526Lys que define o grupo, nomeadamente o grupo IIa, que inclui estirpes que exibem apenas a mutação anterior, os grupos IIb, IIc e IId, que para além da substituição anterior, apresentam as mutações Val502Ala, Val502Thr e Val 449Ile, respetivamente. Garcia-Cobos *et al.* (2007), através de estudos realizados em Espanha, detetou a existência de estirpes com as mutações Met377Ile e Ser385Thr, mas sem as restantes mutações que caracterizavam o grupo III sugerido por Ubukata (Ubukata *et al.*, 2001), e como tal, incluiu as estirpes no grupo designado por “III-like” (Garcia-Cobos *et al.*, 2007). As estirpes que apresentam uma maior suscetibilidade à ampicilina, encontram-se normalmente associadas aos grupos I e II, enquanto os isolados pertencentes ao grupo III, apresentam nitidamente uma maior resistência à ampicilina (Ubukata *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2011; Kaczmarek *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2010).

No que diz respeito à diversidade genética, alguns estudos demonstraram que estirpes BLNAR de *H. influenzae* são genotipicamente diversas com uma ausência generalizada de disseminação clonal (Fluit *et al.*, 2005, Kubota *et al.*, 2006, Tristram *et al.*, 2007). O fato de *H. influenzae* apresentar um sistema eficiente de “uptake” de DNA homólogo, poderá tornar possível que o gene *ftsI*, com mutações, seja transferido de estirpes BLNAR para estirpes suscetíveis, se os pacientes forem colonizados por mais do que uma estirpe (Tristram *et al.*, 2007).

1.9 Resistência Combinada

As estirpes BLPACR foram inicialmente consideradas desta forma, por serem produtoras de β -lactamases e resistentes à amoxicilina-ácido clavulânico, sendo sugerido na altura, que a resistência à amoxicilina-ácido clavulânico era devida à hiperprodução da β -lactamase TEM-1 ou ROB-1, ou à produção de um inibidor de β -lactamase TEM, ROB ou a uma nova β -lactamase. Pode ainda colocar-se a hipótese de sobreposição de PBP3 alteradas e as típicas β -lactamases, TEM-1 ou ROB-1. Atualmente designam-se por BLPACR as estirpes que apresentam as PBP3 alteradas conjuntamente com a produção de β -lactamases.

Foram realizados vários estudos que revelaram que, quando se comparam estirpes BLNAR e BLPACR com substituições idênticas nas PBP3, verifica-se que as BLPACR apresentam uma CIM para a ampicilina muito superior, e uma CIM para as cefalosporinas idêntica, indicando que a contribuição das β -lactamases para a resistência é limitada à ampicilina (Tristram *et al.*, 2007; Matic *et al.*, 2003).

A produção de β -lactamase tem sido desde sempre o mecanismo predominante, com uma prevalência das estirpes produtoras de β -lactamases resistentes à ampicilina (BLPAR) superior a 20% na maioria dos países europeus (Dabernat & Delmas, 2012). Estudos recentes mostram que esta prevalência está a estabilizar e/ou a diminuir, possivelmente em resposta a alterações na terapêutica com antibióticos. No entanto, as estirpes que apresentam resistência não enzimática (BLNAR) e resistência mediada por ambos os mecanismos de resistência (BLPACR) poderão estar a aumentar a sua incidência em algumas regiões (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Sanbongi *et al.*, 2006; Hasegawa *et al.*, 2003), incluindo Portugal (Barbosa *et al.*, 2011).

1.10 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal a caracterização dos dois mecanismos de resistência à ampicilina, o mecanismo enzimático (caracterização do tipo de beta-lactamase) e o não enzimático (análise de mutações do gene *ftsI*) num conjunto pré- definido de estirpes de *H. influenzae* isoladas entre o período de 2009 a 2012.

Como objetivos específicos, pretende-se:

- Determinar a suscetibilidade aos diferentes antibióticos beta-lactâmicos pelo método de microdiluição em placa;
- Determinar a prevalência e a caracterização do tipo de beta-lactamase produzida pelas estirpes produtoras de beta-lactamase;

- Caracterizar o serótipo capsular dos isolados clínicos em estudo;
- Identificar e descrever os padrões de mutações existentes na sequência do gene *ftsI* (amplificação por PCR, purificação e respetiva sequenciação);
- Investigar o grau de diversidade genética existente em algumas das estirpes que apresentam genótipos BLNAR (β -lactamase negativas ampicilina resistentes) e BLPACR (β -lactamase positivas amoxicilina-clavulanato resistentes), pela técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

Com este estudo será ainda possível comparar os resultados obtidos com resultados já publicados pelo Laboratório Nacional de Referencia de Infecções Respiratórias – Agentes respiratórios bacterianos, relativo a *H. influenzae* isolados entre o período de 2001 a 2008 (Barbosa *et al.*, 2011), de forma a perceber a evolução dos mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em estirpes clínicas de *H. influenzae* ao longo dos anos em Portugal.

Sendo de extrema importância o desenvolvimento de projetos de investigação nesta área, e não só a vigilância e referência que tem vindo a ser realizadas, o desenvolvimento deste estudo permitirá conhecer eventuais alterações ao nível da emergência de novos mecanismos de resistência à ampicilina, em infeções respiratórias a *H. influenzae*, contribuindo para a melhoria do conhecimento científico nesta área, o que representará importantes ganhos em Saúde Pública.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

A amostra em estudo incluiu 248 estirpes clínicas de *Haemophilus influenzae*, produtoras e não produtoras de β -lactamase, que foram recolhidas em 16 Centros e Laboratórios Hospitalares em Portugal, entre o período de 2009 a 2012.

As estirpes clínicas foram isoladas de indivíduos de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 0 e os 91 anos, e de diversos produtos biológicos (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Origem das estirpes clínicas de *H. influenzae* isoladas em Portugal entre o período de 2009-2012.

Produto Biológico	Distribuição das estirpes pelos anos de isolamento (2009 – 2012)				
	2009	2010	2011	2012	Total
Expetoração	29	38	36	30	133
Exsudado Ocular	7	6	8	12	33
Exsudado Auricular	1	1	2	1	5
LBA	21	18	16	9	64
Sangue	-	-	-	4	4
Outros	4	2	1	2	9
Total	62	65	63	58	248

LBA: Lavado alveolar, brônquico e brônco-alveolar; **Outros:** Exsudado faríngeo, nasal e nasofaríngeo, Cateter, líquido de diálise, exsudado vaginal, suco gástrico e pus.

As estirpes que constituem a amostra em estudo foram selecionadas entre as estirpes não produtoras de β -lactamase, de acordo com a sua suscetibilidade à ampicilina e ao co-amoxiclave, tendo como base uma concentração mínima inibitória (CIM) superior ou igual a 1 mg/L. Embora estas estirpes sejam consideradas suscetíveis segundo o CLSI (2009), existem vários estudos (Bajanca *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2011; Garcia-Cobos *et al.*, 2007) que demonstraram que em estirpes com uma $CIM \leq 1$ mg/L, podem existir substituições aminoacídicas nas PBP3. Foi ainda selecionado para o estudo, um conjunto de estirpes produtoras de β -lactamase, onde se considerou estudar as substituições aminoacídicas das PBP3 das estirpes com uma $CIM \geq 2$ mg/L para ambos os antibióticos, amoxicilina e co-amoxiclave. Para o grupo controlo, foi selecionado um conjunto de estirpes sensíveis com uma $CIM < 1$ mg/L.

2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por uma técnica de fervura, que consistiu na suspensão de 4 a 5 colónias de *H. influenzae* (após crescimento *overnight* em placas de gelose de chocolate, a 35°C e 5% de CO₂) em 60 µl de água destilada estéril (Sarstedt, Nümbrecht, USA), tendo esta sido fervida em banho-maria numa placa de aquecimento (IKA-Werke GmbH & CO Kg MEC2P, Pombal, Portugal) durante 15 minutos. Após a fervura, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 4 minutos à temperatura ambiente (2K15, Sigma-Aldrich Co.). Após a centrifugação, foi transferido cerca de 40 a 50 µl de sobrenadante para outro tubo Eppendorf devidamente identificado, e armazenado a -20°C.

2.3 Produção de β-lactamase

A produção de β-lactamase foi determinada apenas para algumas das estirpes em estudo (para confirmar resultados discrepantes), uma vez que estes dados já tinham sido obtidos numa fase anterior a este trabalho. Este procedimento é realizado por um teste cromogénio, em que se utiliza uma cefalosporina, o Nitrocefim (Oxoid Limited, UK), e que em contato com uma estirpe produtora de β-lactamase, passa de uma cor amarela a uma cor vermelha, o que significa que o anel β-lactâmico da cefalosporina foi destruído. É um procedimento que implica a suspensão de cerca de 5 colónias de *H. influenzae* em 20 µl de Nitrocefim, e após alguns minutos, é registada a reação colorimétrica.

2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A suscetibilidade aos antibióticos em *H. influenzae* pelo método de microdiluição em placa não foi determinada neste estudo, com exceção de algumas repetições, uma vez que as estirpes selecionadas para o estudo já haviam sido previamente classificadas. Esta técnica consiste na suspensão de 4 a 5 colónias em recipientes com 3 ml de água autoclavada, de forma a obter um padrão de turvação ajustado ao padrão 0,5 de Marcfarland. Este passo é realizado com o auxílio de um leitor de turbidez (MicroScan Turbidity Meter – Siemens). Seguidamente é feita a inoculação de 100 µl desta suspensão em 25 ml de meio de crescimento *Haemophilus* Test Medium (HTM, Dade Behring), e este é distribuído pelas placas MICroSTREP plus tipo 3 (Dade Behring Inc., West Sacramento, USA) por meio de um inoculador (RENOK). As placas são incubadas a 35°C ± 2°C numa atmosfera sem CO₂ por um período de 20-24 horas. A determinação para cada antibiótico é feita pela leitura das placas, observando-se a turbidez de cada poço. A classificação nas diferentes categorias de suscetibilidade: Sensível, Intermédio e Resistente, é feita de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI (2012) (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Critérios interpretativos, segundo o CLSI, dos antibióticos em estudo, na determinação da suscetibilidade em *H. influenzae* (CLSI, 2012).

Agente Antimicrobiano	Abreviatura	Categorias de suscetibilidade (mg/L)		
		Sensível	Intermédio	Resistente
Ampicilina	Amp	≤1	2	≥4
Amoxicilina-Clavulanato	Amc	≤4/2	-	≥8/4
Azitromicina	Azi	≤4	-	-
Cefaclor	Cfr	≤8	16	≥32
Cefepima	Cpe	≤2	-	-
Cefotaxima	Cft	≤2	-	-
Cefuroxima	Crm	≤4	8	≥16
Cloranfenicol	C	≤2	4	≥8
Ciprofloxacina	Cp	≤1	-	-
Meropenem	Mer	≤0.5	-	-
Rifampicina	Rif	≤1	2	≥4
Tetraciclina	Te	≤2	4	≥8
Trimetoprima /sulfametoxazol	SXT	≤0.5/9.5	1/19-2/38	≥4/76

2.5 Deteção e caracterização da cápsula em estirpes de *H. influenzae*

A presença de cápsula nas estirpes de *H. influenzae* foi determinada pela amplificação por PCR, de um fragmento interno do gene *bexA*, com 343 pb. Este gene é apenas amplificado em estirpes capsuladas.

Os serótipos capsulares também foram determinados por PCR, de acordo com Falla e colaboradores (1994), que descreveram os *primers* específicos utilizados na caracterização de cada um dos 6 serótipos capsulares do *H. influenzae*. Este método é considerado de referência na determinação dos serótipos capsulares.

A amplificação do fragmento interno do gene *bexA* foi realizada num volume total de 25 µl, sendo a mistura reacional constituída por 2,5 µl de dNTPs 10 µM (mix com dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Roche Diagnostics GmbH), 0,16 µM de cada primer específico (Eurogentec, Seraing, Belgium) (**Anexo I**), 3,5 mM de MgCl₂ 50 mM (Bioline, UK), 0,5 U de *Taq polimerase* (Biotaq,

Bioline, UK) e 2,5 µl de tampão 10x (Bioline). À master mix de 23,5 µl, adicionou-se 1,5 µl de DNA. Como controlo positivo foi utilizado DNA de estirpes de serótipos conhecidos, isto é, que continham o gene responsável pela expressão de determinado tipo de cápsula (a-f).

A amplificação foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), sendo que as etapas do PCR foram desenvolvidas da seguinte forma: um ciclo de pré-desnaturação de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (*annealing*) e 1 minuto a 72°C (alongamento), e por fim, uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A análise do produto amplificado foi feita por electroforese em gel de agarose (Agarose Multi-purpose-Bioline) a 1% (p/v) em tampão Tris-borato-EDTA (TBE 10x) durante 25 minutos a 100V (i-Mupid, Cosmo Bio., Ltd.). Adicionou-se à agarose, ainda quente, 5 µl de Syber Safe para 100 ml de gel para que fosse possível visualizar as bandas. É colocado em cada poço do gel, 5 µl de produto de PCR purificado e 2 µl de azul de bromofenol. O gel é fotografado no aparelho Gel Doc 2000 (Biorad) e analisado em comparação com o marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH), com bandas entre os 67 pb e os 1114 pb.

O protocolo experimental do PCR para a caracterização do serótipo capsular é idêntico ao descrito anteriormente para a pesquisa de cápsula.

2.6 Genes responsáveis pela produção de β-lactamases por PCR Multiplex

A determinação dos genes responsáveis pela produção de β-lactamases, nomeadamente os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{ROB}, foi realizada por PCR Multiplex.

A amplificação dos genes foi efetuada num volume final de 25 µl, sendo a mistura reacional para uma reação composta por, 2,5 µl de tampão 10x, 0,2 mM de cada um dos 4 dNTPs (Roche Diagnostics GmbH), 0,2 µM de cada primer específico para a amplificação de ambos os genes em ambas as direções *forward* e *reverse* (Rob-R, Rob-F, TEM-R, TEM-F, **Anexo I**), 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM) (Quiagen), 0,5x de Q-solution (Quiagen) e 1,25U de enzima *Taq* Polimerase (Quiagen). Adicionou-se 1 µl de DNA aos 24 µl de mistura reacional.

Foram utilizadas estirpes controlo negativas para a produção de β-lactamase, e estirpes positivas para a presença dos dois genes, *bla*_{TEM} e *bla*_{ROB}.

A amplificação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{ROB} foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa: o primeiro ciclo de pré-desnaturação ocorreu durante 7 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de 15 segundos a

94°C, 15 segundos a 53°C e 15 segundos a 72°C, e por fim, uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A análise do produto amplificado foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a pesquisa de cápsula por PCR, em que foi utilizado o marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH).

2.7 Deteção de mutações no gene *ftsI* que codifica a PBP3

A amplificação do gene *ftsI* nas estirpes de *H. influenzae* em estudo, foi realizada por PCR, num volume final de 25 µl, com dois tipos de enzima, *Taq TaKaRa* e *Bio-X-Act Short Polimerase*, em que aos 24 µl de mistura de reação, foi adicionado 1 µl de DNA.

A mistura reacional utilizada para a 1ª enzima, era constituída por 2 µl de dNTPs Mix (2,5 mM) (TaKaRa, Bio Inc., Shiga, Japão), 1,5 µl de cada *primer* específico (10pm/µl) para a amplificação do gene *ftsI* em ambas as direções *forward* e *reverse* (**Anexo II**), 2U da enzima *TaqTM* (TaKaRa), e 2,5 µl de 10x *Ex Taq* tampão com MgCl₂ (20 mM) (TaKaRa).

A mistura reacional utilizada para a 2ª enzima, por reação, era composta por 2,5 µl de 10x tampão (Bioline, UK), 5 µl de dNTPs (1mM) (TaKaRa, Bio Inc., Shiga, Japão), 1 µM de cada *primer* específico (10pm/µl) para a amplificação do gene *ftsI* em ambas as direções *forward* e *reverse* (**Anexo II**), 1,4 µl de MgCl₂ (50mM) (Bioline, UK) e 2U de polimerase *Bio-X-Act Short* (Bioline, UK).

A amplificação do gene *ftsI* foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), de acordo com os seguintes programas, tendo em conta o tipo de enzima. Para o enzima *Taq TaKaRa*, o primeiro ciclo de pré-desnaturação ocorreu durante 5 minutos a 95°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C e 4 minutos a 72°C, e por fim, uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Para a polimerase *Bio-X-Act Short*, o primeiro ciclo de pré-desnaturação ocorreu durante 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 2 minutos e 30 segundos a 72°C, e por fim, uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A análise do produto amplificado foi realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente para a pesquisa de cápsula por PCR, com exceção do marcador de peso molecular utilizado. Neste caso em concreto, foi utilizado o marcador de peso molecular VII (Roche Diagnostics GmbH), que apresenta bandas entre os 359 e 8576 pb.

2.8 Purificação

A purificação dos produtos de PCR foi efetuada com um reagente designado por ExoSAP-IT, que consiste em duas enzimas hidrolíticas, uma exonuclease (Exonuclease I) e uma fosfatase (rShrimp Alkaline Phosphatase). Tem como função a remoção do excesso de *primers* e dNTPs, nos produtos de PCR.

Para este procedimento adicionou-se 2 µl de ExoSAP-IT a 5 µl do produto resultante do PCR. Esta reação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), em que a enzima foi incubada a 37°C durante um período de 15 minutos, e depois inativada a 80°C durante 15 minutos.

2.9 Sequenciação do gene *ftsI*

A região de DNA do gene *ftsI* correspondente ao domínio da transpeptidase da PBP3 (nucleótidos 840-1713 no gene *ftsI*, e aminoácidos 280-571 nas PBP3) foi sequenciada após purificação e sequenciação direta com o Kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Porto, Portugal). As sequências foram determinadas no sequenciador automático ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Lisboa, Portugal).

A reação de sequenciação cíclica foi efetuada num volume final de 10 µl, sendo a mistura reacional para uma reação composta por 2,5 µl de tampão *Big Dye*, 1,5 µl de *Big Dye Terminator*, 0,4 µl de cada *primer* específico, *ftsI*rev e *ftsI*linrev (**Anexo II**), e 1 µl de DNA purificado.

A sequenciação cíclica foi efetuada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa de sequenciação: o primeiro ciclo de pré-desnaturação ocorreu durante 1 minuto a 96°C, seguidos de 25 ciclos de, 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 3 minutos e 30 segundos a 60°C.

As sequências nucleotídicas obtidas por sequenciação foram analisadas e convertidas em ficheiros FASTA com a ajuda do programa bioinformático FinchTV (versão 1.4 – Geospiza Inc). Estas sequências foram posteriormente convertidas para o seu reverso complementar através do programa Reverse Complement (Paul Stothard, http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), traduzidas para uma sequência de proteínas por meio do ExPASy Translate Tool (ExpASy SIB Bioinformatics, SIB, Switzerland, <http://web.expasy.org/translate/>), e finalmente foi efetuado o alinhamento das sequências analisadas com a sequência original de *H. influenzae* (*Haemophilus influenzae* Rd KW20, GenBank accession Nr NC_000907, NCBI) com o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que nos permitiu detetar as mutações existentes no gene *ftsI* das estirpes em estudo (**Anexo III**).

2.10 *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

A técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi utilizada no processo de genotipagem de alguns isolados clínicos em estudo, tendo sido utilizados *primers* específicos para a amplificação de cada um dos sete fragmentos internos conservados (“*housekeeping genes*”: *adK*, *atpG*, *frdB*, *fuck*, *mdh*, *pgi* e *recA*) do *H. influenzae* Rd (Fleischmann *et al.*, 1995), de acordo com a técnica por Meats e colaboradores (Meats *et al.*, 2003).

As reações de 25 µl foram realizadas em placas de microtitulação de 96 poços (Sarstedt, Nümbrecht, USA), e cada reação era constituída por 2,5 µl de tampão 10x, 5 µl de Q-solution 5x (Quiagen), 5 µl de 1 mM dNTPs (Roche Diagnostics GmbH), 1 µl de 20 µM de cada primer específico para a amplificação dos 7 genes em ambas as direções *forward* e *reverse* (**Anexo IV**), e 1,25U de enzima HotStar *Taq* Polimerase (Quiagen). Adicionou-se ainda 5 µl de DNA aos 20 µl da mistura reacional.

A amplificação dos 7 “*housekeeping genes*” foi realizada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa: o primeiro ciclo de pré-desnaturação ocorreu durante 15 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e por fim, uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A análise do produto amplificado foi realizada de acordo com o procedimento descrito para a pesquisa de cápsula por PCR, em que foi utilizado o marcador de peso molecular VIII (Roche Diagnostics GmbH).

A reação de purificação foi realizada de acordo com o descrito anteriormente para o gene *ftsI*, sendo também utilizada a enzima ExoSAP-IT.

Os fragmentos de DNA purificados foram sequenciados com os *primers* específicos utilizados na amplificação inicial. A amplificação da reação de sequenciação foi efetuada num volume final de 10 µl, sendo a mistura reacional para uma reação composta por 3,5 µl de tampão *Big Dye*, 0,5 µl de *Big Dye Terminator*, 1,125 µl de cada *primer* específico (5µM), (**Anexo IV**), e 1 µl de DNA purificado. Para a sequenciação de cada gene, foi utilizado um *primer* (o F ou o R), uma vez que foi possível obter a sequenciação com apenas um dos *primer*.

A sequenciação foi efetuada num termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, AB), com o seguinte programa: o primeiro ciclo de pré-desnaturação ocorreu durante 1 minuto a 96°C, seguidos de 25 ciclos de, 10 segundos a 96°C (desnaturação), 5 segundos a 50°C (*annealing*) e 3 minutos e 30 segundos a 60°C (alongamento). As sequências foram determinadas no sequenciador automático ABI 3130 XL (Applied Biosystems, Lisboa, Portugal).

A análise das sequências obtidas por MLST foi realizada com o auxílio de uma base de dados de *H. influenzae* disponível em <http://haemophilus.mlst.net>. As sequências foram alinhadas e cortadas de acordo com a comparação do *H. influenzae* Rd, e os eletroferogramas correspondentes foram analisados e submetidos à base de dados.

Cada isolado é definido por 7 números inteiros, que em conjunto definem o seu perfil alélico. A cada perfil alélico, é atribuído um número: “*Sequence type*” (ST), que caracteriza cada um dos isolados. Quando não existe correspondência de algum dos perfis alélicos obtidos com os perfis disponíveis na base de dados internacional, terá que ser enviado ao curador da base de dados, os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse* dessa estirpe, para que possa ser atribuído um novo número ST.

Clusters de STs relacionados entre si, que aparentam descender de um ancestral comum, designam-se por complexos clonais ou linhagens. Foi utilizada a análise goeBURST por intermédio do programa PHYLOVIZ 1.0 (<http://goeburst.phyloviz.net/>) para demonstrar o tipo de relação filogenética existente entre os STs identificados. Esta análise baseia-se no número de diferenças entre os perfis alélicos, sendo os isolados incluídos num determinado complexo clonal (CC). Os STs que diferem em apenas um dos sete *loci* de outro membro do grupo, designam-se por “*single locus variants*” (SLVs), e STs que diferem em dois dos sete *loci* de outro membro do grupo designam-se por “*double locus variants*” (DLVs). Os STs que diferem em dois ou mais alelos de outros STs são designados por “*singletons*”.

Foi ainda utilizado o programa START para a elaboração de um dendograma pelo método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (<http://pubmlst.org/software/analysis/start/>). Esta análise permitiu-nos obter um padrão hipotético de descendência para cada isolado estudado, ilustrando assim as possíveis relações filogenéticas entre os STs considerados.

2.11 Análise Estatística

A relação entre os pacientes clínicos, o tipo de amostra clínica e a suscetibilidade à ampicilina foi analisada recorrendo a uma análise descritiva dos dados (teste do qui-quadrado de ajustamento, χ^2).

A comparação das variáveis entre os grupos considerados na relação entre a suscetibilidade das estirpes clínicas de *H. influenzae* aos antibióticos em estudo, tendo em conta o tipo de cápsula e estirpe (produção de β -lactamase), foi determinada pelo teste do qui quadrado (χ^2) de Pearson.

A suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos das estirpes estudadas, considerando os mecanismos de resistência (grupos mutacionais), e tendo também em conta os dois períodos de estudo, 2001-2008 e 2009-2012, foi analisada, tal como anteriormente, pelo teste do qui quadrado (χ^2) de Pearson, e foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para determinar a associação existente entre os valores de CIM obtidos para cada antibiótico e os isolados clínicos considerados. A comparação da suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos durante o período de 2001 a 2008 foi analisada com o teste t das médias para amostras emparelhadas.

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa SPSS 21.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Consideraram-se diferenças significativas para valores de $p < 0,05$ em testes bicaudais (two-tailed tests).

3. Resultados

3.1 Caracterização das amostras de *H. influenzae*

Foram estudadas 248 estirpes clínicas de *H. influenzae* recolhidas em vários Centros e Laboratórios Hospitalares em Portugal, entre o período de 2009 a 2012.

Do conjunto de estirpes selecionadas para este estudo, 140 eram não produtoras de β -lactamase, com uma CIM à ampicilina ≥ 1 mg/L (BLNAR), e incluíam-se nas várias classes de resistência, segundo os *breakpoints* do CLSI (2012). Distribuem-se em estirpes resistentes, de resistência intermédia e suscetíveis à ampicilina (CIM = 4 mg/L, CIM = 2 mg/L e CIM ≤ 1 mg/L). Foram estudadas ainda 66 estirpes produtoras de β -lactamases, com uma CIM ≥ 8 mg/L (BLPAR), e ainda 42 estirpes suscetíveis à ampicilina com uma CIM ≤ 1 mg/L (BLNAS).

Tabela 4 - Características dos pacientes, tipo de amostra e suscetibilidade à ampicilina das estirpes em estudo, isoladas em Portugal entre o período de 2009-2012.

Características do paciente	Pacientes N (%)	Suscetibilidade à Ampicilina (%)			
		S	I	R	P value
Total	248	144 (58,1)	33 (13,3)	71 (28,6)	
Género					
Masculino	155 (62,5)	87 (56,1)	22 (14,2)	46 (29,7)	Ns
Feminino	92 (37,1)	57 (61,9)	10 (10,9)	25 (27,2)	
Desconhecido	1 (0,4)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	
Idade (anos)					
0-2	56 (22,6)	34 (60,7)	6 (10,7)	16 (28,6)	0,003
3-5	12 (4,8)	8 (66,7)	3 (25,0)	1 (8,3)	
6-20	38 (15,3)	17 (44,7)	10 (26,3)	11 (28,9)	
21-50	32 (12,9)	24 (75,0)	5 (15,6)	3 (9,4)	
>51	109 (44,0)	61 (56,0)	8 (7,3)	40 (36,7)	
Desconhecido	1 (0,4)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	
Tipo de amostra					
Expetoração	133 (53,6)	67 (50,4)	26 (19,5)	40 (30,1)	Ns
Exsudado Ocular	33 (13,3)	21 (63,6)	0 (0)	12 (36,4)	
Exsudado Auricular	5 (2,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	
LBA	64 (25,8)	43 (67,2)	5 (7,8)	16 (25,0)	
Sangue	4 (1,6)	3 (75,0)	1 (25,0)	0 (0)	
Outros	9 (3,6)	6 (66,6)	1 (11,1)	2 (22,2)	

S – Suscetível; I – Intermédio; R – Resistente; Ns – Não significativo

De acordo com a **tabela 4**, a amostra em estudo é constituída por 62,5% de pacientes do género masculino e 37,1% do género feminino, e estes apresentam valores de suscetibilidade à ampicilina muito semelhantes entre si, não existindo diferenças significativas entre eles.

No que diz respeito à idade, verificou-se que existe uma frequência elevada de pacientes com idade superior a 51 anos (44,0%), onde se isolou um número mais elevado de estirpes resistentes à ampicilina (36,7%), quando comparado com as outras faixas etárias. Verificou-se também uma resistência intermédia à ampicilina nas faixas etárias dos 0 aos 2, e dos 6 aos 20 anos. Existem diferenças significativas no que diz respeito aos elevados valores de resistência intermédia à ampicilina, em pacientes que se incluem na faixa etária dos 6 aos 20 anos ($p=0,003$), apresentando um valor superior ao que seria de esperar numa distribuição aleatória. O mesmo acontece com pacientes clínicos de idades superiores a 51 anos, que apresentam valores superiores de resistência à ampicilina ($p=0,003$) ao que seria de esperar quando comparado com os outros valores apresentados para as outras faixas etárias.

A maioria das amostras provém de expetorações (53,6%), seguidas de amostras de sangue ou lavado brônco-alveolar (27,4%), exsudados oculares (13,3%), entre outros. De uma forma geral, não existem diferenças significativas entre os vários tipos de amostra no que diz respeito à resistência à ampicilina.

3.2 Suscetibilidade aos antibióticos

A suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos foi determinada para todas as estirpes incluídas neste estudo, considerando-se no entanto outros antibióticos que são igualmente importantes na terapêutica de infeções causadas por *H. influenzae*. Os antibióticos β -lactâmicos incluem a ampicilina, co-amoxiclave, cefepima, cefotaxima, cefuroxima, cefaclor, e meropenem. Os outros antibióticos pertencem à classe dos macrolídeos (i.e. azitromicina), quinolonas (i.e. ciprofloxacina), sulfonamidas (i.e. trimetoprima-sulfametozaxol), tetraciclina, cloranfenicol e rifampicina.

A análise dos valores das CIM das estirpes em estudo aos antibióticos considerados, mostra que existem variações na suscetibilidade das estirpes, consoante o antibiótico e o fenótipo de resistência (**Tabela 5**).

Tendo em conta que a resistência à ampicilina foi o critério principal de seleção das amostras clínicas em estudo, é um dos antibióticos que apresenta maiores valores de resistência. Verificou-se ainda que existe uma resistência elevada à ampicilina nas estirpes produtoras de β -lactamase (100%), e 20% das estirpes não produtoras de β -lactamases (BLNAR) apresentaram resistência intermédia à ampicilina.

Tabela 5 - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes clínicas (total) de *H. influenzae*, de acordo com a classe de resistência e *breakpoints* do CLSI (2012).

Antibiótico	CIM (µg/ml)			Suscetibilidade (% isolados)			
	50%	90%	Range	S	I	R	NS
Ampicilina	1	> 8	≤0,03 -> 8	58,1	13,3	28,6	0
Co-amoxiclave	2	4	≤0,25 -> 4	99,2	0	0,8	0
Cefotaxima	≤ 0,03	0,12	≤0,03 – 1	100	0	0	0
Cefepime	≤ 0,12	0,25	≤0,12 -> 2	99,6	0	0	0,4
Cefuroxima	2	8	≤0,25 -> 8	85,9	8,1	6,0	0
Cefaclor	8	> 16	≤1 -> 16	66,9	21,4	11,7	0
Meropenem	0,12	0,25	≤0,06 – 1	98,4	0	0	1,6
Ciprofloxacina	≤ 0,06	≤ 0,06	≤0,06 - 0,5	100	0	0	0
Cloranfenicol	≤ 1	≤ 1	≤1 – 2	100	0	0	0
Tetraciclina	≤ 1	≤ 1	≤1 – 4	99,6	0,4	0	0
SXT	≤0,25	>2	≤0,25 -> 2	48,4	4,0	47,6	0
Rifampicina	≤0,5	≤0,5	≤0,5 -> 2	99,6	0	0,4	0
Azitromicina	1	2	≤0,25 – 4	100	0	0	0

S – Suscetível; I – Intermédia; R – Resistente; NS – Não suscetível;

No que diz respeito aos outros antibióticos (**Anexo V**), verificou-se:

- Com exceção de algumas estirpes BLNAR, a maioria das estirpes apresentou suscetibilidade ao co-amoxiclave (99,2%);
- As cefalosporinas de 2ª geração (cefaclor e cefuroxima) são os antibióticos ao qual as estirpes apresentaram maior resistência (I+R), especialmente as BLNAR (32,9% e 14,0%, respetivamente);
- As estirpes, na sua generalidade, são suscetíveis às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Não existem *breakpoints* definidos para o cefepime, uma vez que ainda não foram caracterizadas estirpes resistentes para este antibiótico, mas foi detetada neste estudo uma estirpe que não era suscetível ao cefepime (0,4%);
- As estirpes estudadas apresentaram uma grande suscetibilidade ao meropenem (98,4%), tendo havido no entanto 1,6% das estirpes que não apresentou suscetibilidade a este antibiótico;
- 99,6% das estirpes apresentaram suscetibilidade à tetraciclina, tendo havido apenas uma estirpe com resistência intermédia a este antibiótico (0,4%);
- 99,6% das estirpes apresentaram suscetibilidade à rifampicina, tendo havido apenas uma estirpe resistente a este antibiótico (0,4%);
- Obteve-se uma grande percentagem de estirpes resistentes ao Trimetoprima-sulfametoxazol (51,8%), tendo sido esta percentagem mais elevada nas estirpes BLNAR e BLPACR;
- Todas as estirpes estudadas eram suscetíveis à ciprofloxacina, cloranfenicol e azitromicina;

3.3 Cápsula e a Suscetibilidade aos Antibióticos

Das 248 estirpes clínicas estudadas, 238 são não capsuladas (96%), e 10 são capsuladas (4%). Das estirpes capsuladas, 1 é do serótipo **a**, 1 do serótipo **d**, 4 do serótipo **e**, e 4 do serótipo **f** (Tabela 6). Apenas se apresentam os resultados obtidos para as estirpes não capsuladas e para as de cápsula **f**, visto que as restantes estirpes capsuladas (**a**, **d**, **e**) não apresentaram diferenças significativas entre si e/ou com os restantes fenótipos.

Tabela 6 - Suscetibilidade das estirpes clínicas (total) de *H. influenzae* aos antibióticos em estudo, de acordo com a cápsula e produção de β -lactamase.

Antibiótico	Cápsula	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			Suscetibilidade (% isolados)				P value
		50%	90%	Range	S	I	R	NS	
Ampicilina	NC (<i>bla</i> -) (173)	1	2	$\leq 0,03 - 4$	78,0	19,1	2,9	-	0,000
	NC (<i>bla</i> +) (65)	> 8	> 8	1 ->8	0,0	0,0	100,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,25	0,25	0,25	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	> 8	> 8	> 8	0,0	0,0	100,0	-	
Co-amoxiclave	NC (<i>bla</i> -) (173)	2	4	$\leq 0,25 -> 4$	98,8	-	1,2	-	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	1	2	0,5 - 4	100,0	-	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,25	0,5	$\leq 0,25 - 0,5$	100,0	-	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	2	2	2	100,0	-	0,0	-	
Cefotaxima	NC (<i>bla</i> -) (173)	0,06	0,12	$\leq 0,03 - 1$	100,0	-	-	0,0	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03 - 0,12$	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	0,25	0,25	0,25	100,0	-	-	0,0	
Cefepime	NC (<i>bla</i> -) (173)	0,25	0,5	$\leq 0,12 - 2$	100,0	-	-	0,0	0,000
	NC (<i>bla</i> +) (65)	$\leq 0,12$	0,25	$\leq 0,12 - 0,5$	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	$\leq 0,12$	>2	$\leq 0,12 -> 2$	66,7	-	-	33,3	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	2	2	2	100,0	-	-	0,0	
Cefuroxima	NC (<i>bla</i> -) (173)	2	8	$\leq 0,25 -> 8$	79,8	11,6	8,7	-	0,024
	NC (<i>bla</i> +) (65)	1	2	$\leq 0,25 - 4$	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,5	0,5	0,5	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	4	4	4	100,0	0,0	0,0	-	
Cefaclor	NC (<i>bla</i> -) (173)	8	>16	$\leq 1 -> 16$	59,0	26,6	14,5	-	0,001
	NC (<i>bla</i> +) (65)	8	16	$\leq 1 -> 16$	84,6	10,8	4,6	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	> 16	> 16	> 16	0,0	0,0	100,0	-	
Meropenem	NC (<i>bla</i> -) (173)	0,12	0,5	$\leq 0,06 - 1$	97,7	-	-	2,3	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	$\leq 0,06$	0,12	$\leq 0,06 - 0,5$	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,12	0,5	$\leq 0,06 - 1$	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	0,12	0,12	0,12	100,0	-	-	0,0	

Das estirpes capsuladas, as de serótipo **a** e **d** são suscetíveis a todos os antibióticos testados. As estirpes de serótipo **e** eram suscetíveis a todos os antibióticos, com exceção do SXT, em que apresentavam 75% de resistência (Anexo VI).

Das 4 estirpes de serótipo **f**, duas destacaram-se pela sua resistência a determinados antibióticos. Uma das estirpes era não produtora de β -lactamase, e era considerada não suscetível à cefepime ($p=0,000$), sendo esta diferença significativa, uma vez que apresentava um valor superior ao que seria de esperar relativamente às outras estirpes; a outra estirpe era produtora de β -lactamase, resistente à ampicilina, SXT e ao cefaclor, e apresentou também, relativamente aos outros fenótipos, um valor superior ao que seria de esperar para

este último antibiótico ($p=0,001$) sendo essa diferença significativa. Ambas as estirpes são provenientes de pacientes clínicos de idades compreendidas entre os 0 e 2 anos de idade, e de exsudados auriculares.

A maioria das estirpes não capsuladas apresentou suscetibilidade aos antibióticos co-amoxiclave, às cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, à ciprofloxacina, ao cloranfenicol, à tetraciclina, rifampicina e azitromicina (**Anexo VI**). Verificou-se que das estirpes não capsuladas, as não produtoras de β -lactamase apresentam maior resistência (I+R) às cefalosporinas de 2ª geração, nomeadamente à cefuroxima (20,3%) e ao cefaclor (41,1%), ao SXT (55,5%) e à ampicilina (22,0%). As estirpes produtoras de β -lactamase para além de apresentarem uma elevada resistência à ampicilina (100,0%), eram também resistentes ao SXT (43,1%), e ao cefaclor (15,4%). Existem diferenças significativas entre as estirpes *bla*- e *bla*+ no que diz respeito à suscetibilidade à ampicilina ($p=0,000$), em que as estirpes *bla*+ apresentam valores muito superiores de resistência à ampicilina quando comparado às estirpes *bla*-. Os valores de suscetibilidade à cefuroxima ($p=0,024$) e ao cefaclor ($p=0,001$) são significativamente diferentes entre as estirpes produtoras e não produtoras de β -lactamase. As primeiras apresentam valores superiores ao que seria de esperar quanto à suscetibilidade para ambos os antibióticos (com exceção da estirpe *bla*+ cápsula f), enquanto as estirpes *bla*- apresentam um valor superior ao que seria de esperar relativamente à resistência aos antibióticos considerados.

3.4 Produção de β -lactamase

Das 248 estirpes estudadas, 66 são produtoras de β -lactamase (26,6%), e todas apresentam o gene *bla*_{TEM-1} (100%), não se tendo encontrado nenhuma estirpe com o gene *bla*_{ROB-1}. Estas estirpes apresentam uma suscetibilidade reduzida à ampicilina, o que é característico de estirpes que possuam o mecanismo enzimático de resistência à ampicilina.

3.5 Mutações no gene *ftsI* que codifica a PBP3

A resistência à ampicilina em *H. influenzae* pode ser mediada por um mecanismo não enzimático em que existem alterações nas PBP3, e que são causadas por mutações no gene *ftsI*, provocando uma diminuição da afinidade das PBP3 para com os antibióticos β -lactâmicos. As mutações no gene *ftsI* foram identificadas após amplificação total do gene (1833 pb) e respetiva sequenciação da região responsável pela função da transpeptidase das PBP3, que se situa entre os 840 e os 1713 pb (Barbosa *et al.*, 2011).

A sequenciação foi realizada em 144 estirpes clínicas de *H. influenzae* suscetíveis à ampicilina, e em 104 estirpes de suscetibilidade reduzida à ampicilina, podendo estas serem

ou não produtoras de β -lactamase. Das 248 estirpes em estudo, 204 apresentaram mutações no gene *ftsI* (82,3%), enquanto 44 não apresentaram mutações no gene *ftsI* (22 estirpes não produtoras de β -lactamase sensíveis à ampicilina, BLNAS, e 22 produtoras de β -lactamase, resistentes à ampicilina, BLPAR).

Com a análise das sequências obtidas, verificou-se a existência de substituições aminoacídicas que apresentavam maior frequência que outras. Das 204 estirpes com mutações, 181 apresentavam com grande frequência a substituição aminoacídica de uma valina por uma isoleucina (Val547Ile; 88,7%), seguida de 157 estirpes que apresentavam a substituição de uma asparagina por uma lisina (Asn526Lys; 76,9%) e ainda 148 estirpes que apresentavam a substituição de asparagina por uma serina (Asn569Ser; 72,6%).

Foi utilizada a classificação de Ubukata *et al.* (2001) e a de Dabernat *et al.* (2002) para a caracterização das estirpes em estudo pelos vários grupos mutacionais. Segundo Ubukata *et al.* (2001), as estirpes podem ser classificadas em 3 grupos distintos, de acordo com as diferentes substituições aminoacídicas, e segundo Dabernat *et al.* (2002), o grupo II pode ser subdividido em 4 grupos (IIa, IIb, IIc e IId). Verificou-se que existiam 39 estirpes (21 não produtoras de β -lactamase e 18 produtoras de β -lactamase) que apresentavam mutações no gene *ftsI*, mas que não se incluíam em nenhum grupo mutacional, e através delas não foi possível estabelecer uma relação direta com o mecanismo de resistência não enzimático à ampicilina.

A **tabela 7** ilustra as substituições de aminoácidos no gene *ftsI* para os isolados gBLNAR (n=160) e gBLPACR (n=44), próximo dos domínios conservados SSN e KTG das PBP3. A identificação destas mutações deu origem a 40 padrões mutacionais, tendo em conta as várias substituições (**Anexo III**). É de salientar ainda que a grande maioria das substituições encontraram-se próximo do domínio KTG. O grupo II é o mais frequente, e corresponde a 78,5% das estirpes que apresentam alterações nas PBP3, e dentro do grupo II, o grupo mais comum é o IIb, constituído por 84 estirpes (52,1%), seguido do grupo IIc, constituído por 52 estirpes (32,3%).

Tabela 7 - Substituições aminoacídicas identificadas na região da transpeptidase do gene *ftsI*

Group ^a	Nº of isolates ^b		Amino acid substitution																		
			near SSN motif									near KTG motif									
			Bla -	Bla +	Asp350	Ser357	Ala368	Met377	Ser385	Leu389	Ala437	Ile449	Leu456	Gly490	Ala502	Arg517	Asn526	Ala530	Thr532	Val547	Ala554
I	1								Ser						His			Ile	Thr	Ser	
II a	1		Asn									Glu			Lys	Ser					
	1											Glu			Lys	Ser		Ile		Ser	
		1										Glu			Lys	Ser					
	2														Lys						
	1		Asn												Lys	Ser					
	1		Asn					Ile							Lys				Ile		Ser
II b		1	Asn									Glu	Val		Lys			Ile		Ser	
	2	1	Asn										Val		Lys						
	1		Asn										Val		Lys			Ile			
	3											Glu	Val		Lys			Ile		Ser	
		1											Val		Lys			Ile		Ser	
	17	10	Asn										Val		Lys			Ile		Ser	
	3											Glu	Val		Lys			Ile		Ser	
	5	1											Val		Lys			Ile		Ser	
	4	1											Val		Lys						
	4	2	Asn										Val		Lys			Ile		Ser	
	2		Asn					Ile					Val		Lys			Ile		Ser	
	1		Asn										Val	Ser	Lys			Ile		Ser	
	4		Asn					Ile					Val		Lys			Ile		Ser	
	3	1	Asn					Ile					Cys		Lys			Ile		Ser	
	1		Asn		Pro			Ile					Val		Lys			Ile		Ser	
II c	32		Asn										Thr		Lys			Ile		Ser	
	1		Asn										Thr		Lys			Ile			
	1		Asn										Thr		Lys					Ser	
	4		Asn										Thr		Lys			Ile		Ser	
	4												Thr		Lys			Ile		Ser	
	2	2											Thr		Lys			Ile			
	4												Thr		Lys						
	1												Val		Lys						
	1				Thr								Thr		Lys						
II d	6	3													Lys			Ile		Ser	
	1														Lys			Ile		Ser	
	1		Asn												Lys			Ile			
	1														Lys						
	1												Val	Val	Lys			Ile		Ser	
III-like	5		Asn	Asn			Ile	Thr							His			Ser	Ile		
	1		Asn	Asn			Ile	Thr	Phe						His			Ser	Ile	Ser	
Miscellaneous	21	18																			

a As estirpes com mutações no gene *ftsI* foram classificadas em 6 grupos: I e II (a, b, c and d) de acordo com Dabernat *et al.* (2002) e III-like de acordo com García-Cobos *et al.* (2008); b *Bla+*, Estirpes produtoras de β -lactamase; *Bla-*: Estirpes não produtoras de β -lactamase.

A substituição aminoacídica característica do grupo I, de uma arginina pela histidina (Arg517His), foi observada em apenas 2 estirpes. Uma delas é produtora de β -lactamase, e outra é não produtora de β -lactamase, e ambas apresentaram diferentes padrões mutacionais.

O grupo II é caracterizado pela substituição de uma asparagina por uma lisina na posição 526, foi observado em 157 estirpes, e apresentou 36 padrões mutacionais. Pela análise da **tabela 7**, verificou-se:

- O grupo IIa é caracterizado pela substituição Asn526Lys, podendo haver ou não substituições adicionais. Constituído por 8 estirpes, sendo 2 produtoras de β -lactamase e 6 não produtoras de β -lactamase, e estas deram origem a 7 padrões mutacionais, sendo as substituições aminoacídicas mais frequentes a Asp350Asn, Gly490Glu e Ala530Ser;
- O grupo IIb caracteriza-se pela substituição de uma alanina por uma valina, na posição 502 (Ala502Val), podendo no entanto apresentar substituições adicionais como a Asn526Lys ou Asp350Asn. Este grupo era constituído por 84 estirpes (das quais 18 eram produtoras de β -lactamase), e apresentaram 15 padrões mutacionais diferentes, em que as substituições adicionais que surgiram com maior frequência foram: Asp350Asn, Met377Ile, Asn526Lys, Val547Ile e Asn569Ser. Salienta-se ainda que as estirpes BLNAR apresentaram uma grande diversidade de padrões mutacionais, o mesmo não acontecendo com as estirpes BLPACR, que apresentaram um número reduzido de padrões;
- O grupo IIc, à semelhança do grupo IIb, é caracterizado pela substituição de uma alanina por uma treonina, na posição 502 (Ala502Thr). Era composto por 52 estirpes distribuídas por 9 padrões mutacionais. Destas estirpes, apenas duas eram produtoras de β -lactamase, e ambas apresentaram o mesmo padrão de mutações. As substituições aminoacídicas de maior frequência foram: Asp350Asn, Asn526Lys, Val547Ile e Asn569Ser.
- O grupo II d caracteriza-se pela substituição de uma isoleucina por uma valina, na posição 449. Constituído por 13 estirpes, das quais 3 eram produtoras de β -lactamase, e dividiu-se em 5 padrões mutacionais. As 3 estirpes BLPACR apresentaram o mesmo padrão de mutações, sendo também este o padrão que ocorreu com maior frequência nas BLNAR. As substituições aminoacídicas mais frequentes foram: Asn526Lys, Val547Ile e Asn569Ser.

O grupo III-like foi descrito por Garcia-Cobos e colaboradores (2007), e caracteriza-se por apresentar substituições nos domínios KTG e STVK, adicionais às apresentadas por Ubukata *et al.* (2001). Não foram encontradas estirpes que se incluíssem no grupo do tipo III da classificação de Ubukata, mas foram caracterizadas seis estirpes que se enquadravam no grupo III-like. Eram estirpes não produtoras de β -lactamase (BLNAR), que se dividiram em 2 padrões mutacionais, e a maioria apresentou o mesmo padrão de mutações. As

substituições aminoacídicas adicionais eram representadas pela Ser357Asn, Met377Ile, Ser385Thr, Leu389Phe, Arg517His, Thr532Ser, Val547Ile e Asn569Ser.

3.6 Relação entre os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos e os genótipos de resistência

Com os resultados obtidos pela sequenciação do gene *ftsI*, reorganizou-se o conjunto das estirpes caracterizadas anteriormente, de acordo com o fenótipo de resistência à ampicilina, pelas várias classes de genótipos (gBLNAS, gBLPAR, grupo I/II gBLNAR, grupo III-like gBLNAR e grupo I/II gBLPACR) (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição das estirpes por genótipos e respectiva percentagem na amostra total.

Genótipo	N (%)
gBLNAS	22 (8,8%)
gBLPAR (TEM-1)	22 (8,8%)
I/II gBLNAR	133 (53,6%)
III-like gBLNAR	6 (2,4%)
I/II gBLPACR	26 (10,5%)
Misc	39 (15,7%)
Total	248 (100,0%)

A prevalência de cada genótipo entre as 248 estirpes de *H. influenzae* estudadas distribuiu-se da seguinte forma:

- Vinte e duas estirpes eram não produtoras de β -lactamase, não apresentavam qualquer mecanismo de resistência à ampicilina, e pertenciam ao genótipo gBLNAS (8,8%);
- Das estirpes produtoras de β -lactamase, vinte e duas (8,8%) apresentavam somente o mecanismo enzimático, sendo incluídas no genótipo gBLPAR (TEM-1);
- Vinte e seis estirpes (10,5%) que apresentavam ambos os mecanismos de resistência, enzimático e não enzimático, foram incluídas no genótipo I/II gBLPACR;
- As estirpes não produtoras de β -lactamase, e com alterações nas PBP3, foram distribuídas por dois genótipos diferentes: 133 estirpes (53,6%) BLNAR foram incluídas no genótipo I/II gBLNAR, e 6 estirpes (2,4%) no genótipo III-like gBLNAR.

Analisando a relação existente entre as estirpes selecionadas com base na CIM à ampicilina e os genótipos de resistência obtidos, constataram-se algumas observações no que diz respeito à sua suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos:

- Das 42 estirpes clínicas com o fenótipo BLNAS, 20 foram incluídas no genótipo gBLNAR, uma vez que apresentavam mutações no gene *ftsI*, mas estas não pareciam estar envolvidas no mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Existiram exceções em duas dessas estirpes, sendo que uma delas era resistente à cefepime (Grupo “Miscelâneo” – com mutações aleatórias, não envolvidas na resistência à ampicilina), e outra pertencia ao grupo mutacional IIb, e era resistente à cefuroxima e ao cefaclor;
- Das estirpes com uma CIM à ampicilina igual a 1 mg/L (n=103), três não apresentavam mutações no gene *ftsI*. Das 100 estirpes com mutações no gene *ftsI*, 40 eram resistentes ao cefaclor, e destas, 7 apresentavam resistência intermédia à cefuroxima. Não se detetou resistência aos outros antibióticos β -lactâmicos;
- Todas estirpes com uma CIM à ampicilina igual a 2 mg/L (n=33) apresentaram mutações no gene *ftsI*, com exceção de uma estirpe. Das 32 estirpes com mutações, duas apresentavam resistência ao co-amoxiclave, 16 eram resistentes ao cefaclor, e destas, 8 apresentavam resistência à cefuroxima;
- Todas as estirpes com uma CIM à ampicilina igual a 4 mg/L (n=5) apresentaram mutações no gene *ftsI*. Das 5 estirpes, 4 eram resistentes ao cefaclor, e destas, uma apresentava resistência intermédia à cefuroxima. Foi ainda detetada uma estirpe não suscetível ao meropenem;
- As estirpes que apresentavam uma CIM à ampicilina superior ou igual a 8 mg/L (n=66) incluíam-se no grupo das estirpes produtoras de β -lactamase. Das estirpes que não apresentaram mutações no gene *ftsI* (BLPAR, n=22), apenas uma apresentou resistência ao cefaclor, e das estirpes que apresentaram mutações (BLPACR, n=44), três eram resistentes ao cefaclor, sendo todas as outras estirpes, suscetíveis aos outros antibióticos β -lactâmicos.

A suscetibilidade dos isolados clínicos de *H. influenzae* em estudo aos antibióticos β -lactâmicos, tendo em conta os genótipos descritos, estão representadas na **tabela 9**.

Tabela 9 - Suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos (CIM) das estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos.

Antibiótico	Genótipo de resistência	CIM (mg/L)			Suscetibilidade (%)			P-value
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Range	S	I	R	
Ampicilina	gBLNAS (22)	0.12	1	≤0.03 – 2	95.5	4.5	0	0,000
	gBLPAR (22)	> 8	> 8	8 -> 8	0	0	100.0	
	I/II gBLNAR (133)	1	2	0.12 - 4	73.7	23.3	3.0	
	III gBLNAR (6)	1	1	1 - 4	83.3	0	16.7	
	I/II gBLPACR (27)	> 8	> 8	1 -> 8	0	0	100.0	
Co-amoxiclave	gBLNAS (22)	≤0.25	1	≤0.25 – 2	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	1	2	0.5 – 4	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	2	4	≤0.25 -> 4	98.5	0	1.5	
	III gBLNAR (6)	2	2	1 - 2	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (27)	2	2	1 - 4	100.0	0	0	
Cefotaxima	gBLNAS (22)	≤0.03	≤0.03	≤0.03 – 0.06	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.03	≤0.03	≤0.03	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	0.06	0.12	≤0.03 – 1	100.0	0	0	
	III gBLNAR (6)	0.12	0.12	0.12 – 0.5	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (27)	≤0.03	0.06	≤0.03 – 0.25	100.0	0	0	
Cefepima	gBLNAS (22)	≤0.12	0.25	≤0.12 – 0.25	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.12	≤0.12	≤0.12 – 0.25	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	0.25	0.5	≤0.12 - 2	100.0	0	0	
	III gBLNAR (6)	0.5	0.5	0.25 - 1	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (27)	≤0.12	0.25	≤0.12 - 2	100.0	0	0	
Cefuroxima	gBLNAS (22)	0.5	4	≤0.25 - 4	100.0	0	0	0,000
	gBLPAR (22)	0.5	1	0.5 - 1	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	2	8	0.5 -> 8	78.9	12.8	8.3	
	III gBLNAR (6)	> 8	> 8	4 -> 8	16.7	16.7	66.7	
	I/II gBLPACR (27)	2	4	1 - 4	100.0	0	0	
Cefaclor	gBLNAS (22)	≤1	8	≤1 - 8	100.0	0	0	0,000
	gBLPAR (22)	8	16	2 -> 16	86.4	9.1	4.5	
	I/II gBLNAR (133)	8	> 16	2 -> 16	52.6	29.3	18.0	
	III gBLNAR (6)	16	16	16 -> 16	0	83.3	16.7	
	I/II gBLPACR (27)	8	16	2 -> 16	84.6	11.5	3.8	
Meropenem	gBLNAS (22)	≤0.06	0.12	≤0.06 – 0.25	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.06	≤0.06	≤0.06 – 0.25	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	0.12	0.5	≤0.06 – 1	97.0	0	3.0	
	III gBLNAR (6)	0.12	0.12	≤0.06 – 0.12	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (27)	0.12	0.25	≤0.06 – 0.5	100.0	0	0	

Analisando esta relação, tendo como comparação as estirpes de genótipo gBLNAS, verificou-se:

- A maioria dos isolados gBLNAS era suscetível aos antibióticos β -lactâmicos, havendo apenas uma estirpe que apresentava resistência intermédia à ampicilina;
- As estirpes produtoras de β -lactamase apresentaram um aumento de cerca de 70x da CIM₅₀ à ampicilina nas estirpes gBLPAR e I/II gBLPACR, em relação às estirpes BLNAS, sendo esta diferença significativa ($p=0,000$). Existe ainda uma correlação bastante significativa entre as estirpes produtoras de β -lactamase e a suscetibilidade à ampicilina ($p=0,000$);

- As estirpes com genótipo gBLPAR apresentaram um aumento de 4x da CIM₅₀ do co-amoxiclave, sendo suscetíveis aos restantes β-lactâmicos;
- As estirpes de genótipo I/II gBLPACR, I/II gBLNAR e III-like gBLNAR apresentaram um aumento de 8x da CIM₅₀ do co-amoxiclave e 2x para o meropenem. Detetaram-se duas e quatro estirpes do genótipo I/II gBLNAR que eram resistentes e não suscetíveis ao co-amoxiclave e meropenem, respetivamente.
- As estirpes do genótipo gBLNAR e gBLPACR dos grupos mutacionais I e II apresentaram um aumento de 8x da CIM₅₀ para o cefaclor, havendo 39 estirpes gBLNAR com resistência intermédia ao cefaclor e 24 resistentes (p=0,000); existiam ainda 3 estirpes produtoras de β-lactamase (gBLPACR) com resistência intermédia e 1 resistente ao cefaclor;
- Verificou-se um aumento generalizado da CIM₅₀ para todos os antibióticos β-lactâmicos das estirpes do genótipo I/II gBLNAR: 8x para a ampicilina, co-amoxiclave e cefaclor; 4x para a cefuroxima e 2x para a cefotaxima, cefepime, e meropenem; eram na sua maioria suscetíveis à cefuroxima e ao cefaclor (p=0,000), mas apresentavam um número significativo de estirpes com resistência intermédia à cefuroxima (p=0,000) e ao cefaclor (p=0,000);
- As estirpes de genótipo III-like apresentaram um aumento dos valores da CIM₅₀ para os antibióticos cefotaxima (4x), cefepima (4x), cefuroxima (16x) e cefaclor (16x), quando comparado com os outros genótipos. Os valores de resistência intermédia ao cefaclor (p=0,000) e de resistência à cefuroxima (p=0,002) são significativamente diferentes, quando comparados com os outros genótipos. Embora houvesse uma estirpe resistente, de uma forma geral, estas estirpes são suscetíveis à ampicilina; todas as estirpes são suscetíveis à cefotaxima, cefepime e meropenem.

No que diz respeito aos outros antibióticos (não β-lactâmicos), com exceção do SXT, todas as estirpes apresentaram suscetibilidade a esses antibióticos. As estirpes de genótipos I/II gBLNAR, I/II gBLPACR e gBLNAS apresentaram valores de resistência (I+R) ao SXT de 63,1%, 46,2% e 31,8% respetivamente (p=0,000), e as estirpes de genótipos gBLPAR e III-like gBLNAR apresentaram níveis de resistência inferiores, de 18,2% e 16,7%, respetivamente (**Anexo VII**).

Detetou-se ainda uma estirpe do genótipo gBLNAS que apresentou resistência à rifampicina.

3.7 Evolução dos mecanismos de resistência em estirpes clínicas de *H. influenzae* aos antibióticos β -lactâmicos

A **tabela 10** tem como objetivo comparar as diferenças nas suscetibilidades aos antibióticos β -lactâmicos de *H. influenzae* isolados da clínica entre dois períodos distintos, de 2001 a 2008, e de 2009 a 2012, tendo em conta os mecanismos de resistência descritos.

Tabela 10 - Suscetibilidade aos antibióticos (%) das estirpes estudadas, em dois períodos, 2001-2008 e 2009-2012, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos.

Antibiótico	Genótipo de resistência ^a	Suscetibilidade (%)						P-value
		2001 - 2008			2009 - 2012			
		S	I	R	S	I	R	
Ampicilina	gBLNAS	92,4	3,0	4,5	95,5	4,5	0	0,013
	gBLPAR	0	3,0	97,0	0	0	100,0	
	I/II gBLNAR	42,4	53,2	4,3	73,7	23,3	3,0	
	III gBLNAR	50,0	0	50,0	83,3	0	16,7	
	I/II gBLPACR	0	0	100,0	0	0	100,0	
Co-amoxiclave	gBLNAS	100,0	0	0	100,0	0	0	Ns
	gBLPAR	94,0	6,0	0	100,0	0	0	
	I/II gBLNAR	97,8	0	2,2	98,5	0	1,5	
	III gBLNAR	100,0	0	0	100,0	0	0	
	I/II gBLPACR	97,9	0	2,1	100,0	0	0	
Cefotaxima	gBLNAS	100,0	0	0	100,0	0	0	Ns
	gBLPAR	94,0	0	6,0 ^b	100,0	0	0	
	I/II gBLNAR	100,0	0	0	100,0	0	0	
	III gBLNAR	100,0	0	0	100,0	0	0	
	I/II gBLPACR	100,0	0	0	100,0	0	0	
Cefepime	gBLNAS	98,5	0	1,5 ^b	100,0	0	0	Ns
	gBLPAR	94,0	0	6,0 ^b	100,0	0	0	
	I/II gBLNAR	100,0	0	0	100,0	0	0	
	III gBLNAR	100,0	0	0	100,0	0	0	
	I/II gBLPACR	100,0	0	0	100,0	0	0	
Cefuroxima	gBLNAS	91,0	6,0	3,0	100,0	0	0	Ns
	gBLPAR	91,0	6,0	3,0	100,0	0	0	
	I/II gBLNAR	67,4	18,5	14,1	78,9	12,8	8,3	
	III gBLNAR	50,0	0	50,0	16,7	16,7	66,7	
	I/II gBLPACR	97,9	0	2,1	100,0	0	0	
Cefaclor	gBLNAS	87,9	6,0	6,1	100,0	0	0	Ns
	gBLPAR	66,6	12,1	15,2	86,4	9,1	4,5	
	I/II gBLNAR	46,7	28,3	25,0	52,6	29,3	18,0	
	III gBLNAR	0	50,0	50,0	0	83,3	16,7	
	I/II gBLPACR	57,4	29,8	12,8	84,6	11,5	3,8	
Meropenem	gBLNAS	98,5	0	1,5 ^b	100,0	0	0	0,016
	gBLPAR	94,0	0	6,0 ^b	100,0	0	0	
	I/II gBLNAR	93,5	0	6,5 ^b	97,0	0	3,0 ^b	
	III gBLNAR	50,0	0	50,0 ^b	100,0	0	0	
	I/II gBLPACR	100,0	0	0	100,0	0	0	

S, suscetível; I, intermédio; R, resistente; a Classificação baseada nas mutações identificadas no gene *ftsI*: gBLNAS, estirpes sem mutações; gBLPAR (TEM-1), produtoras de β -lactamases sem mutações; gBLPACR, produtoras de β -lactamase com mutações; gBLNAR, estirpes não produtoras de β -lactamase com mutações; b Percentagem de estirpes não suscetíveis ao Meropenem.

Verificou-se:

- De uma forma geral, houve um aumento da suscetibilidade aos antibióticos β -lactâmicos entre o primeiro e o segundo período para os genótipos gBLNAS, gBLPAR, I/II gBLNAR e I/II gBLPACR;
- A suscetibilidade à ampicilina das estirpes produtoras de β -lactamase no período atual mantém-se idêntica ao período 2001-2008 (**Anexo VIII**), enquanto as estirpes de genótipo gBLNAS e gBLNAR sofreram um decréscimo na resistência ao antibiótico, sendo esta diferença significativa ($p=0,013$);
- Os valores de resistência aos antibióticos co-amoxiclave, cefotaxima, cefepima e meropenem sofreram um decréscimo em todos os genótipos de resistência; os valores relativos ao meropenem são significativamente diferentes entre os dois períodos considerados ($p=0,016$);
- As estirpes dos genótipos gBLNAs, gBLPAR e I/II gBLPACR apresentaram valores consideravelmente superiores relativamente à suscetibilidade aos antibióticos cefuroxima e cefaclor entre o primeiro e segundo período;
- Houve uma diminuição da resistência à cefuroxima pelas estirpes de genótipo I/II gBLNAR entre o primeiro e segundo período;
- As estirpes do genótipo III-like gBLNAR apresentaram valores de resistência elevados para a cefuroxima e nenhuma das estirpes era suscetível ao cefaclor;

É importante mencionar que esta comparação de resultados foi feita a partir de dados obtidos do estudo de Barbosa e colaboradores (2011). Este estudo envolveu a caracterização de 240 estirpes, onde apenas uma estirpe apresentava cápsula, do tipo b, sendo as restantes não capsuladas. Todas as estirpes produtoras de β -lactamase apresentavam o gene *bla*_{TEM-1}. A frequência de genótipos obtidos foi: gBLNAS (66; 27,5%), I/II gBLNAR (92; 38,3%), III gBLNAR (2; 0,8%), gBLPAR (33; 13,8%) e I/II gBLPACR (47; 19,6%).

A **tabela 11** compara sumariamente as substituições identificadas no domínio da transpeptidase do gene *ftsI* dos isolados clínicos de *H. influenzae*, nos dois períodos, tendo em conta os mecanismos de resistência descritos.

Tabela 11 - Comparação do número de estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos (grupo mutacional) e número de padrões mutacionais em dois períodos: 2001-2008 e 2009-2012.

Grupo mutacional	2001-2008			2009-2012			2001-2012
	Isolados		Padrões Mutacionais (N)	Isolados		Padrões Mutacionais (N)	Padrões idênticos
	<i>Bla-</i>	<i>Bla+</i>		<i>Bla-</i>	<i>Bla+</i>		
I	3	0	2	1	1	2	0
IIa	7	1	5	6	2	7	2
IIb	55	40	15	66	18	15	8
IIc	17	6	5	50	2	9	3
IId	10	0	3	10	3	5	1
III-like	2	0	1	6	0	2	1
Total	94	47	31	160	44	40	15
Misc	27	-	-	21	18	-	-

Verificou-se:

- Numa primeira análise do grupo de estirpes isoladas entre 2009-2012, e em comparação com o período de 2001-2008 (**Anexo IX**), observou-se um aumento substancial de estirpes *bla-* do grupo mutacional IIc, um aumento relativo de estirpes *bla-* do grupo IIb, e uma diminuição considerável das estirpes *bla+* do grupo IIb;
- Tendo em conta o grupo mutacional, verificou-se um aumento relativo do número de padrões mutacionais entre os dois períodos, e destes, observou-se diferenças entre os padrões mutacionais de cada grupo mutacional;
- A análise estatística verificou que o número de estirpes *bla-* do grupo mutacional IIc no período de 2009 a 2012 foi superior ao que seria de esperar relativamente ao número de estirpes *bla-* no período de 2001 a 2008 ($p=0,009$); o mesmo acontecendo com as estirpes *bla-* do grupo mutacional IIb, que apresentou um valor superior ao que seria de esperar relativamente ao número de estirpes no período anterior ($p=0,004$);
- No que diz respeito às estirpes produzidas de β -lactamase verificou-se o contrário, em que houve um decréscimo acentuado do número de estirpes do grupo mutacional IIb entre os dois períodos considerados ($p=0,004$), sendo o seu valor inferior ao que seria de esperar tendo em conta o número de estirpes existentes entre 2001 e 2008; e uma diminuição do seu número dentro do grupo IIc ($p=0,009$), visto o número de estirpes ser relativa inferior ao que seria de esperar;

3.8 Natureza filogenética dos genótipos gBLNAR e gBLPACR por *Multilocus Sequence Typing*

A caracterização dos isolados clínicos de genótipo gBLNAR e gBLPACR, e sua relação clonal foi estudada pela técnica de *Multilocus Sequence Typing*, que consistiu na amplificação e sequenciação de fragmentos internos de sete “housekeeping genes” do *H. influenzae* (Figura 7).

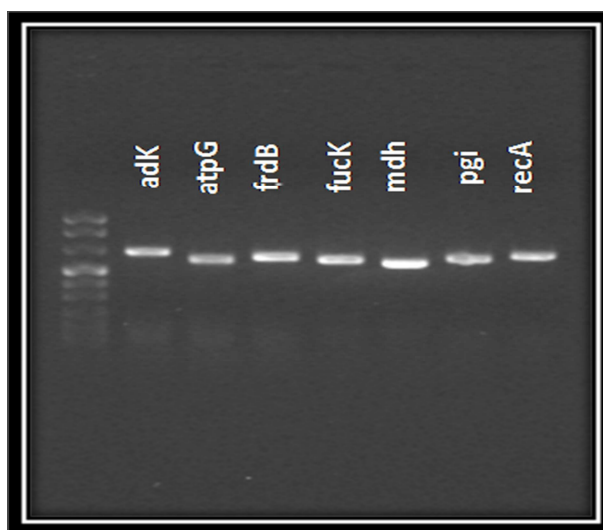


Figura 7 - Amplificação dos 7 fragmentos internos conservados em *H. influenzae*

Este estudo foi realizado em 34 estirpes não capsuladas (22 estirpes do genótipo gBLNAR e 12 estirpes do genótipo gBLPACR), selecionadas com base no seu grupo e padrão mutacional. Destas estirpes, 26 pertencem ao grupo mutacional IIb, 4 ao grupo IIc, e 4 ao grupo III-like.

Foram identificados 11 STs já conhecidos e incluídos na base de dados internacional, e identificados 2 novos STs nas 34 estirpes consideradas para este estudo, conforme indicado na **tabela 12**.

Tabela 12 - Resultados obtidos por MLST para os isolados *H. influenzae* BLNAR dos grupos mutacionais IIb, IIc e III-like, e para os isolados BLPACR dos grupos mutacionais IIb e IIc.

Genótipo	Grupo	N	"Housekeeping genes"							ST
			<i>adK</i>	<i>atpG</i>	<i>frdB</i>	<i>fucK</i>	<i>mdH</i>	<i>pgi</i>	<i>recA</i>	
BLPACR	IIb	7	44	2	16	37	17	2	3	165
BLPACR	IIb	2	14	7	1	30	1	21	1	422
BLPACR	IIb	1	1	8	1	14	9	14	13	11
BLPACR	IIc	2	10	2	15	8	26	61	3	396
BLNAR	IIc	1	5	1	1	1	1	2	5	14
BLNAR	III	4	16	8	16	16	30	1	3	155
BLNAR	IIb	1	52	1	1	14	89	62	37	203
BLNAR	IIb	4	55	11	16	14	111	2	3	310
BLNAR	IIb	3	14	51	16	48	29	2	31	556
BLNAR	IIb	6	55	11	16	14	89	113	3	834
BLNAR	IIb	1	124	113	16	16	69	2	3	1177
BLNAR	IIb	1	124	113	16	14	69	2	3	X
BLNAR	IIc	1	11	2	15	8	17	61	3	Y

As estirpes clínicas, no seu conjunto, apresentaram uma grande diversidade, uma vez que os 13 STs identificados distribuíram-se por 3 complexos clonais (CC) constituído por 2 STs cada, e por 7 "singletons" (Figura 8).

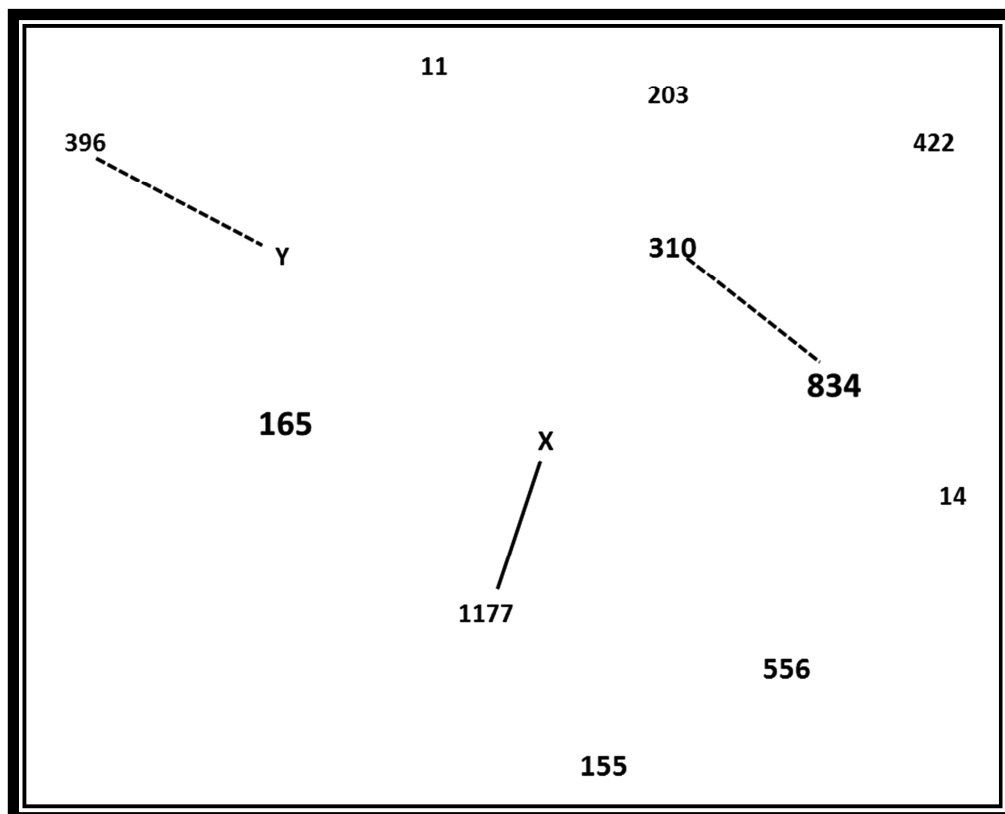


Figura 8 - Distribuição dos STs identificados por complexos clonais e "singletons".

Os complexos clonais que estão representados na **figura 8** correspondem a diferentes níveis de associação entre as estirpes, de acordo com as diferenças que as mesmas apresentam entre si quanto aos seus perfis alélicos. Os complexos clonais ligados entre si por um traço contínuo, correspondem a STs que diferem entre si por 1 *locus*, e os que apresentam uma ligação a tracejado, diferem entre si por 2 *loci*. Verificou-se:

- Os dois isolados correspondentes às estirpes de ST1177 e STX são *single locus variants* (SLVs) e formam um complexo clonal, diferindo entre si em apenas 1 *locus* (*fuck*). Ambas as estirpes BLNAR incluem-se no grupo mutacional IIb, onde apresentam as mesmas substituições aminoacídicas;
- O complexo clonal que inclui as estirpes do ST310 e do ST834 (*double locus variants* - DLVs) é constituído por 10 estirpes não produtoras de β -lactamase (BLNAR), do grupo mutacional IIb, e onde todas as estirpes apresentam o mesmo padrão mutacional. Estas estirpes diferem entre si em 2 *loci* (*mdH* e *pgi*)
- Tal como na situação anterior, a diferença entre os perfis alélicos das estirpes de ST396 e STY (DLVs) é de 2 *loci* (*adK* e *mdH*). Este grupo é constituído por 3 estirpes, duas produtoras de β -lactamase e uma não produtora de β -lactamase, do mesmo grupo (IIId) e padrão mutacional;
- Existem 7 “*singletons*” que apresentam um máximo de 1 a 2 *loci* em comum entre si. Este “grupo” é constituído por 19 estirpes, das quais 10 são produtoras de β -lactamase, pertencentes ao grupo mutacional IIb, e com o mesmo padrão mutacional; 9 são não produtoras de β -lactamase, em que 1 pertence ao grupo IIId, 4 pertencem ao grupo mutacional IIb com um padrão mutacional idêntico entre si, e 4 ao grupo III-like, apresentando também o mesmo padrão de mutações.

A **figura 9** corresponde a um dendograma obtido pelo método UPGMA (“*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*”), construído com base nas diferenças dos perfis alélicos dos isolados clínicos de *H. influenzae* considerados. O dendograma apresentado baseia-se numa matriz de distância (genética) entre os isolados, e nele estão representadas linhas que estão ligadas segundo os níveis de similaridade que agrupam isolados ou grupos de isolados. A análise do dendograma (**Figura 9**) conjuntamente com a **tabela 12** permitiu-nos constatar alguns pontos:

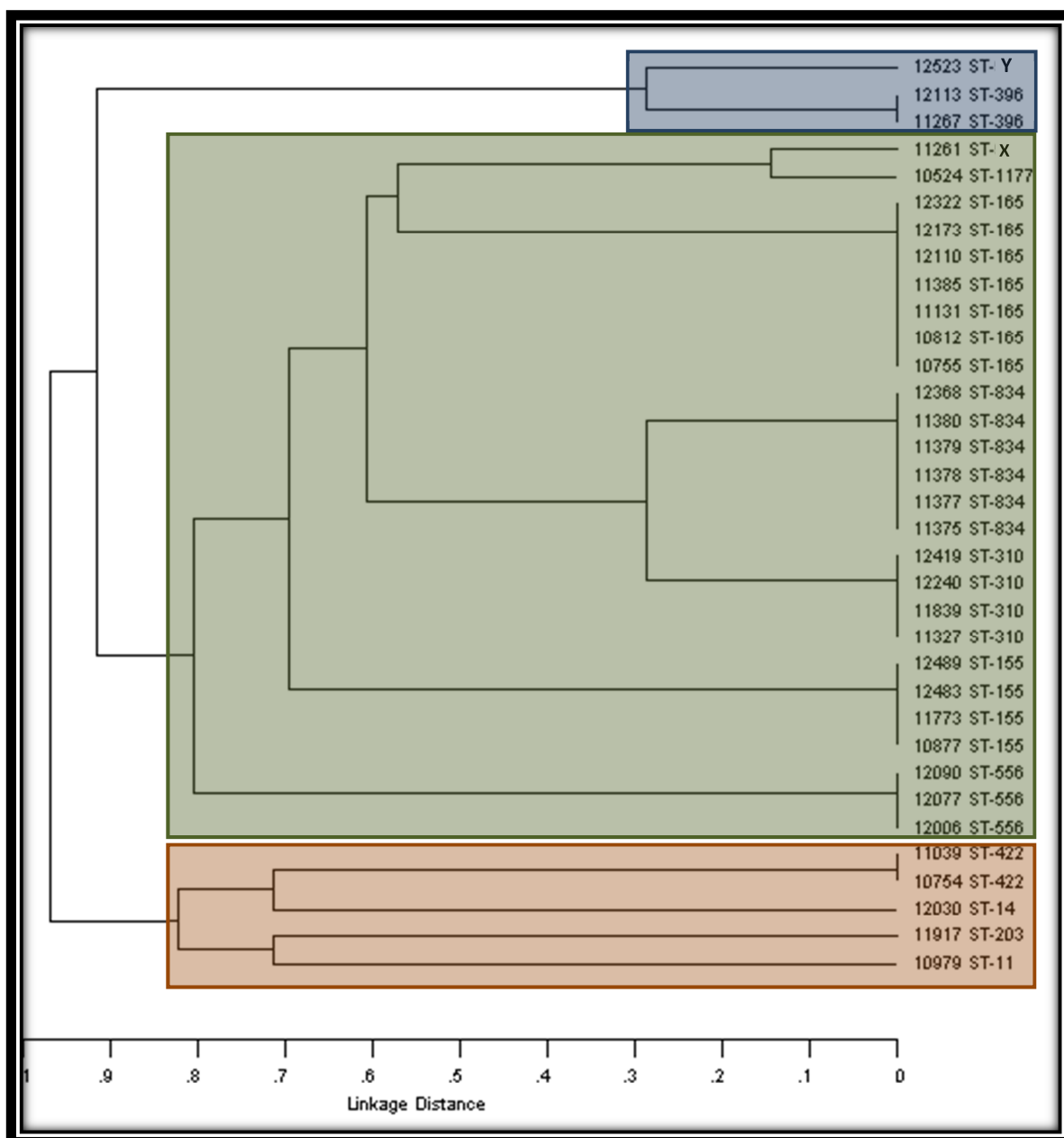


Figura 9 - Dendrograma obtido pelo método de UPGMA, que representa a relação filogenética existente entre os STs dos isolados clínicos em estudo. Está representado no dendrograma o número da estirpe com o ST correspondente.

- Não se observaram *clusters* formados com base nos dois mecanismos de resistência à ampicilina, ou seja, não se verificou uma relação direta entre as distâncias filogenéticas das estirpes BLNAR e das estirpes BLPACR. No entanto, num caso verificou-se proximidade genética entre as estirpes BLPACR e BLNAR;
- O dendrograma suporta a hipótese gerada pelo programa goeBURST, representada na **figura 8**, na medida em que mostra as relações principais existentes entre os isolados que estão mais próximos filogeneticamente;

- Pelo menos 3 grupos de isolados destacaram-se entre os outros apresentando uma distância filogenética menor entre si, nomeadamente as estirpes 11261 (STX) e 10524 (ST1177), 12523 (STY) e 12113 (ST396), e ainda o conjunto das estirpes do ST834 com as do ST310, por ordem decrescente;
- Parece haver algum tipo de relação entre as distâncias filogenéticas das estirpes e o grupo mutacional das mesmas, uma vez que estirpes mais próximas filogeneticamente apresentam os mesmos grupos mutacionais. Contudo esta ligação nem sempre se verifica;
- As estirpes de ST422, ST14, ST11 e ST203 estão num ramo completamente separado das outras estirpes consideradas, e por isso assume-se que estas sejam substancialmente diferentes do restante grupo de isolados (grupo delineado a castanho);
- As estirpes de STY e ST396 são filogeneticamente próximas, e embora sejam de génotipos diferentes, apresentam o mesmo grupo mutacional, IIId (grupo delineado a azul). Tal como na situação anterior, estas estirpes situam-se num ramo que é distante geneticamente do grupo principal, e por isso também se considera que estas estirpes são diferentes das restantes estirpes;
- O grupo principal (delineado a verde) é constituído por estirpes de ambos os génotipos, em que a grande maioria pertence ao grupo mutacional IIb; existem, no entanto, 4 estirpes pertencentes ao grupo III-like. Verificou-se que as estirpes de ST1177 e STX apresentam uma grande proximidade entre si, e estas apresentam algumas semelhanças com as estirpes de ST165. Destacou-se também um outro grupo filogeneticamente próximo entre si que é constituído pelas estirpes de ST310 e ST834, e que no dendograma, se une ao grupo anteriormente mencionado, sendo geneticamente próximo do mesmo. A este grupo, associaram-se as estirpes de ST155 (BLNAR, III-like), e ao grupo anterior, as estirpes de ST556 (BLNAR, IIb). Estes dois últimos grupos são os que apresentaram maior distância filogenética dentro do grupo principal;

4. Discussão

4.1 Suscetibilidade aos antibióticos

Desde os anos 70 que a epidemiologia de *Haemophilus influenzae* tem vindo a sofrer alterações devido à emergência e evolução da resistência aos antibióticos, seja pela resistência enzimática via produção de β -lactamase, como pela introdução das vacinas conjugadas contra o Hib em vários países, e ainda pela emergência de estirpes que apresentam resistência não enzimática aos antibióticos β -lactâmicos através das alterações das PBPs (Dabernat & Delmas, 2012).

Em relação ao estudo aqui apresentado, a análise dos valores de resistência aos antibióticos, de acordo com o genótipo de resistência para cada estirpe, permitiu verificar que de uma forma geral, a maioria dos antibióticos testados, nomeadamente o co-amoxiclave, as cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (cefotaxima e cefepime, respetivamente), o meropenem (carbapenem), a ciprofloxacina (quinolonas), a tetraciclina, o cloranfenicol, a rifampicina e a azitromicina (macrolídeos), apresentam uma boa atividade *in vitro* contra as estirpes estudadas de *H. Influenzae*. É de salientar que, segundo alguns estudos, a suscetibilidade reduzida a alguns destes antibióticos, poderá estar relacionada com alterações nas PBPs (Hasegawa *et al.*, 2006; Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Ubukata *et al.*, 2001)

Embora muito utilizados nos anos 60 e 70, o cloranfenicol e a tetraciclina, tornaram-se antibióticos obsoletos devido à sua potencial toxicidade, aumento da resistência bacteriana e ao aparecimento de outros antibióticos de maior eficácia (cefalosporinas de 3^a geração). A suscetibilidade atual a estes antibióticos poderá estar associada ao facto de estes não serem normalmente prescritos em tratamentos de infeções causadas por *H. influenzae*. A ampicilina, juntamente com a amoxicilina/ácido clavulânico são atualmente os antibióticos institucionalizados em Portugal, como tratamento de primeira linha nas infeções provocadas por *H. influenzae*. Até à data, não foram descritas estirpes resistentes às cefalosporinas de largo espectro, como é o caso da cefotaxima.

As estirpes estudadas apresentaram uma menor suscetibilidade à ampicilina, às cefalosporinas de 2^a geração (cefuroxima e cefaclor) e ainda ao trimetoprima-sulfametoxazol. O primeiro isolado clínico resistente à ampicilina surgiu em 1972, e desde então, tem-se vindo a observar um aumento exponencial, a nível mundial, da resistência à ampicilina. Existe alguma resistência associada às estirpes BLNAR, devido à presença de PBPs alterados com reduzida afinidade para com os β -lactâmicos. A resistência às cefalosporinas de 2^a geração, cefuroxima e cefaclor, é claramente superior nas estirpes não produtoras de β -lactamase, e segundo alguns estudos, parece existir uma correlação entre a resistência destas cefalosporinas com a existência de mutações no gene *ftsI* (Straker *et al.*, 2003; Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). Segundo Needham (1988), estes antibióticos não

deverão ser considerados na terapia de infecções invasivas de *H. influenzae*, uma vez que apresentam uma menor atividade *in vitro*. No que diz respeito ao antibiótico SXT, ainda que este seja utilizado no tratamento e profilaxia de pacientes com infecções do trato urinário e do trato respiratório superior, a sua importância clínica diminuiu consideravelmente ao longo das décadas pela rápida disseminação de resistência, e ainda pelos efeitos secundários que este provoca (Eliopoulos, 2001). Os resultados obtidos neste estudo, mostram que existe uma elevada resistência das estirpes estudadas a este antibiótico, tal como se tem verificado em outros estudos em outros países como o Canadá, Finlândia, Estados Unidos e Espanha (Eliopoulos, 2001; Karpanoja *et al.*, 2008; Sill&Tsang,2008). De acordo com estes estudos, este resultado poderá estar associado a uma prescrição elevada deste antibiótico, uma vez que este é largamente utilizado em várias infecções, levando conseqüentemente a um elevado consumo do mesmo, e conseqüentemente haja uma maior resistência ao mesmo. Uma vez que os valores de resistência são superiores nas estirpes BLNAR e BLPACR, é possível que as alterações nas PBPs possam também influenciar a diminuição da suscetibilidade ao SXT (Eliopoulos, 2001).

4.2 Cápsula e Suscetibilidade aos antibióticos

Com a introdução das vacinas conjugadas, a incidência das infecções causadas por Hib diminuíram rapidamente e significativamente nos países que incorporaram a vacina no seu Plano Nacional de Vacinação. Atualmente, nestes países, as infecções invasivas causadas por *H. influenzae* são provocadas por estirpes HiNC e de serótipo não-b, e ainda que estas não atinjam a prevalência das infecções por Hib no período pré-vacina Hib, os seus valores têm vindo a aumentar substancialmente nos últimos anos (Ulanova&Tsang, 2009; Ladhani *et al.*, 2010). As infecções provocadas por estirpes de serótipo não-b são extremamente raras, e a maioria é causada por *H. influenzae* do tipo e e f. Estas apresentam uma diversidade genética restrita, e no caso do serótipo f, a maioria das infecções ocorre em adultos em condições subjacentes, e são considerados patógenos oportunistas (Ladhani *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2004).

A amostra definida para este estudo é constituída maioritariamente por estirpes não capsuladas (n=238, 96%), havendo no entanto, uma pequena percentagem de estirpes capsuladas (n=10, 4%). Conforme descrito na literatura, também neste estudo existe uma maior incidência de estirpes NC em pacientes de idades entre os 0 a 2 anos e superior a 50 anos (Ladhani *et al.*, 2010; Ulanova&Tsang, 2009). Das estirpes capsuladas, destacam-se essencialmente estirpes de serótipo e (n=4) e serótipo f (n=4). Segundo Bajanca e colaboradores (2004), verificou-se em Portugal, após a implementação da vacina Hib, um declínio das estirpes Hib, de 81% para 16%, e um aumento das estirpes NC de 19% para 80%, tendo ainda sido detetada pela primeira vez uma estirpe invasiva de serótipo f no período de pós-vacinação. Os dados obtidos parecem traduzir a realidade que se faz sentir atualmente a nível mundial e que foi anteriormente descrita. Estudos realizados nos Estados Unidos e no

Canadá verificaram um aumento de incidência de doença invasiva de serótipo **a** após o período de vacinação (Ulanova&Tsang, 2009), embora também se observe um aumento de infecções provocadas por estirpes de serótipo **e** e **f**. Também Ladhani e colaboradores (2010) mostraram que a nível europeu, se verificou um aumento considerável de estirpes capsuladas de serótipo não-b, especialmente as de serótipo **f**, **e** e **a**, por ordem decrescente de prevalência.

No que diz respeito à suscetibilidade aos antibióticos, verificou-se que as estirpes não capsuladas apresentaram uma maior resistência à ampicilina (*bla+*), às cefalosporinas de 2ª geração, ao SXT, e ainda foi detetada nas estirpes *bla-* uma pequena percentagem de resistência ao co-amoxiclave, meropenem e rifampicina. Estes resultados são justificados pelo que foi descrito na secção anterior. As estirpes de serótipo **f** (n=4) apresentaram uma suscetibilidade reduzida ao cefepime (*bla-*, BLNAR), ao cefaclor e SXT (*bla+*, BLPACR). No caso das estirpes de serótipo **f**, a estirpe resistente à cefepime, é suscetível a todos os outros antibióticos testados, não se inclui em nenhum grupo mutacional e apresenta três substituições aminoacídicas nas PBP3. Como ainda não foi descrita nenhuma estirpe resistente ao cefepime, podemos considerar que este caso em particular poderá estar associado à cápsula do tipo **f**, ou ao mecanismo não enzimático característico das estirpes BLNAR. No segundo caso, ainda que segundo os *breakpoints* do CLSI (2012) a estirpe não seja resistente à cefotaxima e cefepime, esta apresenta valores próximos do limiar de resistência, ou seja, com um MIC de 1 mg/L e 2 mg/L, respetivamente; e pertence ao grupo mutacional IIa, diferindo em apenas uma substituição aminoacídica relativamente à estirpe anterior (Asn526Lys). Como apresenta ainda resistência ao cefaclor e SXT, é muito provável que haja uma ligação com o mecanismo não enzimático, também associado às estirpes BLPACR, e descrito em outros estudos realizados (Osaki *et al.*, 2005; Sanbongi *et al.*, 2006; Bae *et al.*, 2010).

4.3 Mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos

A incidência dos vários fenótipos de resistência observados em *H. influenzae* têm vindo a sofrer alterações ao longo dos anos. A produção de β -lactamase, foi, desde sempre, o mecanismo predominante, com uma prevalência das β -lactamases positivas resistentes à ampicilina (BLPAR) entre as estirpes de *H. influenzae*, superior a 20% na maioria dos países europeus (Dabernat&Delmas, 2012). Estudos recentes mostram que esta prevalência está a estabilizar e/ou a diminuir, possivelmente em resposta a alterações na terapêutica antibiótica. No entanto, as estirpes que apresentam resistência não enzimática (BLNAR) e resistência mediada por ambos os mecanismos de resistência (BLPACR) poderão estar a aumentar a sua incidência em algumas regiões (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Sanbongi *et al.*, 2006; Hasegawa *et al.*, 2003), incluindo Portugal (Barbosa *et al.*, 2011).

4.3.1 Mecanismo enzimático mediado pela produção de β -lactamase

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos, mediada pela produção de β -lactamase, é muito comum em *H. influenzae*. A prevalência de estirpes produtoras de β -lactamase na Europa é elevada para alguns países como Reino Unido, França, e Espanha, chegando a atingir os 38% em Portugal (Fluit *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2006). Com os estudos realizados desde 1996 até à data presente, verificou-se que a prevalência de estirpes produtoras de β -lactamase em Portugal situa-se entre os 10% e os 30%, mas tem vindo a diminuir (Bajanca-Lavado *et al.*, 1996; Bajanca *et al.*, 2004, Barbosa *et al.*, 2011). Em países como o Japão, Alemanha, Itália e Holanda, a sua prevalência atinge valores muito inferiores (Farrell *et al.*, 2005).

Segundo Farrell e colaboradores (2005), através de um estudo realizado (PROTEKT) com 2.225 estirpes produtoras de β -lactamase provenientes de vários países, verificou-se que a distribuição a nível global das β -lactamases TEM-1 e ROB-1 era de 96,7% e 4,6%, respetivamente. Constatou-se também com este estudo que a enzima ROB-1 é exclusiva de regiões como os Estados Unidos, Canadá e México. Em Portugal, existe uma maior frequência da enzima TEM-1 em comparação com a enzima ROB-1, nomeadamente 81,4% e 2,3%. Todas as 66 estirpes produtoras de β -lactamase incluídas neste estudo apresentam o gene *bla*_{TEM-1}. Destas, 66,7% (n=44) apresentavam mutações no gene *ftsI*, sendo que em 59,1% (n=26), estas mutações estão associados ao mecanismo de resistência não enzimático (BLPACR). Estes valores estão em concordância com os encontrados em países como Espanha (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Sevillana *et al.*, 2009) e França (Dabernat *et al.*, 2002), ao contrário de países como o Japão, Coreia do Sul, ou ainda os Estados Unidos (Kim *et al.*, 2007, Kishii *et al.*, 2010; Tristram *et al.*, 2007), que apresentam valores muito inferiores aos referidos acima.

4.3.2 Mecanismo não enzimático mediado por alterações nas PBP3

As primeiras estirpes de *H. influenzae* não produtoras de β -lactamase e resistentes à ampicilina (BLNAR) foram descobertas por Thornsberry e Kirven em 1974 quando estes realizavam um teste rápido para a determinação de produção de β -lactamase (Tristram *et al.*, 2007). Estas estirpes permaneceram raras nos anos 80 e 90 em países como a Finlândia (0,2%), Europa ocidental (0,3%), e os Estados Unidos (2,5%), mas em estudos de vigilância recentes, foram divulgados valores consideravelmente elevados para países com a Espanha (34% a 56%), Coreia do Sul (29%) e Japão (23% a 43%) (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Takahata *et al.*, 2008). Acredita-se que a diversidade da prevalência das estirpes BLNAR se deva aos diferentes antibióticos β -lactâmicos que são prescritos no tratamento de infeções do trato respiratório. Ou seja, enquanto nos Estados Unidos e Europa é recomendada uma elevada dosagem de co-amoxiclave como antibiótico de primeira linha para o tratamento de infeções respiratórias adquiridas na comunidade, no Japão são utilizadas cefalosporinas para o mesmo tratamento (Takahata *et al.*, 2008).

Em Portugal, a incidência de estirpes BLNAR tem vindo a aumentar significativamente ao longo dos anos. Entre 1989 a 2001, não tinham sido ainda detetadas estirpes BLNAR, sendo as primeiras descritas entre 2001 e 2008, num estudo que envolveu 240 isolados clínicos de *H. influenzae*, onde foram caracterizadas 94 estirpes BLNAR (Barbosa *et al.*, 2011). A incidência destas estirpes, no período delineado para este estudo (2009-2012), manteve-se relativamente constante ao período anterior.

Em 2001, quando Ubukata *et al.* analisou os perfis das PBPs de estirpes BLNAR de origem japonesa, e estudou pela primeira vez, as mutações específicas do gene *ftsI* que codificam as PBP3, verificou que estas eram as principais responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Vários estudos realizados até à data a nível global, revelam um aumento na diversidade de padrões de substituições aminoacídicas, que pode variar de região para região, e que tem vindo a aumentar paralelamente com o aumento global da prevalência das BLNAR (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2010; Osaki *et al.*, 2005). Tendo em conta que estas substituições de aminoácidos resultam de mutações pontuais, existe uma grande probabilidade de haver um aumento da diversidade de padrões, tal como da sua frequência. Como consequência, é muito expectável que haja igualmente um incremento na diversidade de estirpes com resistência elevada aos antibióticos (Dabernat&Delmas, 2012).

Em Espanha, as estirpes BLNAR são classificadas em dois dos grupos mutacionais definidos por Ubukata *et al.* (2001), nomeadamente o grupo I (Arg517His) e o grupo II (Asn526Lys), uma vez que estas substituições são as de maior prevalência nos isolados espanhóis (Garcia-Cobos *et al.*, 2007). As estirpes descritas e incluídas no grupo III-like por Garcia-Cobos e seus colaboradores (2007), foram detetadas pela primeira vez em 2007. Em 1988, foram detetadas em França, estirpes pertencentes aos grupos I, IIa e IIb, enquanto os subgrupos IIc e IId apenas foram descritos entre 1989 e 1991, respetivamente. Estirpes pertencentes ao grupo III e III-like foram detetadas pela primeira vez em 2007, e mostram que a diversidade de padrões mutacionais tem vindo a aumentar (Dabernat&Delmas, 2012). No Japão, encontram-se com maior frequência isolados pertencentes ao grupo II e III. Segundo Sanbongi e colaboradores (2006), os isolados clínicos japoneses com a substituição Arg517His têm diminuído ao longo do tempo (de 1995 a 2003), havendo sim um aumento que se revelou constante nesse período, da substituição Asn526Lys, e ainda das substituições Met377Ile, Ser385Thr e Leu389Phe (de 5,8% para 18,5%). Estudos realizados em outros países, nomeadamente na Noruega, Austrália, Canadá, Estados Unidos, e Coreia do Sul, mostraram que é pouco comum encontrar estirpes pertencentes ao grupo III (Witherden *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2010; Shuel&Tsang, 2009; Skaare *et al.*, 2009).

Das 160 estirpes BLNAR analisadas, não foram detetadas estirpes que se enquadrassem no grupo III descrito por Ubukata *et al.* (2001), mas foram analisadas e caracterizadas seis estirpes clínicas que apresentavam para além das substituições aminoacídicas típicas do grupo III, Met377Ile, Ser385Thr, Leu389Phe, apresentavam ainda substituições adicionais

como a Ser357Asn, Arg517His, Thr532Ser, Val547Ile e Asn569Ser, e por isso incluímo-las no grupo III-like, descrito por Garcia-Cobos e colaboradores (2007).

Os restantes isolados clínicos BLNAR analisados foram incluídos nos grupos I e II, sendo o segundo o de maior prevalência (78,5%), e o subgrupo IIb o que apresentou maior número de estirpes (52,1%). Estes dados estão de acordo com a literatura descrita para este grupo em estudos realizados em outros países, nomeadamente na Espanha, França, Coreia e Japão (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Dabernat&Delmas, 2012; Bae *et al.*, 2010; Sanbongi *et al.*, 2006, Osaki *et al.*, 2005). Tendo em conta o que foi descrito anteriormente, verificou-se ainda que a substituição aminoacídica Asn526Lys é das que apresentam maior predominância (76,9%), o que se torna consistente com os estudos realizados em outros países, onde esta mutação surge com bastante frequência no gene *ftsI* (Hasegawa *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Sevillano *et al.*, 2009).

As substituições Val547Ile e Asn569Ser surgiram igualmente com grande frequência neste estudo, em 87,8% e 72,2% das estirpes, respetivamente. Embora estas substituições não se incluam em nenhum dos grupos mutacionais descritos, e não haja estudos realizados, que associem estas substituições ao mecanismo de resistência não enzimático, pensa-se que estas poderão contribuir para uma redução da suscetibilidade a determinados antibióticos β -lactâmicos. A literatura existente apenas contempla uma sequência aminoacídica muito pequena da região da transpeptidase das PBP3, e por isso é pouco frequente incluírem as substituições Val547Ile e Asn569Ser. Estas mutações já foram analisadas em países como o Japão, Austrália, Noruega, Canadá, e ocorrem com alguma frequência (Skaare *et al.*, 2009; Shuel&Tsang, 2009; Witherden *et al.*, 2011; Osaki *et al.*, 2005; Kubota *et al.*, 2006).

As estirpes BLPACR têm surgido com maior incidência em países como Portugal, Espanha, França, Estados Unidos, Japão e Coreia (Barbosa *et al.*, 2011; Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Sanbongi *et al.*, 2006; Dabernat&Delmas, 2012; Kim *et al.*, 2007). No nosso estudo, caracterizaram-se quarenta e quatro estirpes BLPACR (17,7%), estando estas distribuídas pelos grupos I e II (Ubukata *et al.*, 2001; Dabernat *et al.*, 2002). Estes dados estão em consonância com os valores obtidos em estudos realizados em Espanha (Garcia-Cobos *et al.*, 2008; Sevillano *et al.*, 2009) e Japão (Hasegawa *et al.*, 2006). No que diz respeito às substituições aminoacídicas, as que ocorrem com maior frequência neste estudo, para estas estirpes, são exatamente: Asp350Asn, Met377Ile, Ala502Val, Asn526Lys, Val547Ile e Asn569Ser. Estas substituições são muito semelhantes às que estão descritas em estudos realizados em Espanha (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Sevillano *et al.*, 2009), França (Dabernat&Delmas, 2012), Noruega (Skaare *et al.*, 2009) ou Canadá (Shuel&Tsang, 2009).

4.4 Relação entre os fenótipos de suscetibilidade aos antibióticos e os genótipos de resistência

Como já foi referido anteriormente, segundo os *breakpoints* do CLSI (2012), as estirpes BLNAR são definidas fenotipicamente pela ausência de β -lactamase e apresentam uma CIM à ampicilina ≥ 4 mg/L, sendo assim consideradas resistentes. No entanto, existem vários estudos realizados, incluindo este, onde foram detetadas estirpes de CIM à ampicilina ≤ 1 mg/L com mutações no gene *ftsI*, tendo sido consideradas estirpes BLNAR (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2011; Kishii *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2006). Considerando que estas estirpes se inserem na categoria de suscetível (CLSI, 2012), que a deteção de mutações é normalmente efetuada por meio de técnicas moleculares morosas, e tendo em conta os *breakpoints* atualmente definidos para a ampicilina, é urgente que seja feita uma atualização da sua definição, quer pela revisão dos *breakpoints*, quer pelas estandarização dos procedimentos de identificação destas estirpes, uma vez que o que está implementado atualmente, poderá estar a interferir com a deteção laboratorial de um número considerável de isolados BLNAR.

As estirpes produtoras de β -lactamase, BLPAR e BLPACR consideradas neste trabalho destacaram-se pela sua resistência elevada à ampicilina, o que se deve claramente ao tipo de mecanismo associado. Não existiram diferenças significativas entre os dois fenótipos no que diz respeito às CIMs, que variaram entre CIM=8mg/L e CIM \geq 8mg/L, o que não se verificou noutros estudos, em que constatarem algumas diferenças nas CIM das estirpes BLPAR relativamente às estirpes BLPACR, para a ampicilina, co-amoxiclave e meropenem (Garcia-Cobos *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2010; Hasegawa *et al.*, 2006).

A contribuição das β -lactamases para a resistência é limitada à ampicilina, não conferindo a mesma resistência às cefalosporinas ou ao co-amoxiclave (Tristram *et al.*, 2007; Matic *et al.*, 2003). Todas as estirpes BLPAR e BLPACR estudadas são suscetíveis ao co-amoxiclave, o que não é surpreendente na medida em que o ácido clavulânico é bastante eficaz na inativação da enzima (Bush, 1988). As estirpes BLNAR, como não produzem β -lactamase, também não sofrem a ação do ácido clavulânico, traduzindo-se assim em CIMs semelhantes para a ampicilina e co-amoxiclave. Kubota e colaboradores (2006) analisaram estirpes BLPACR e BLNAR que apresentam suscetibilidade reduzida ao co-amoxiclave, mas que não eram resistentes. De acordo com as recomendações do CLSI, existem antibióticos que deveriam ser considerados resistentes apesar da aparente sensibilidade *in vitro* nas estirpes BLNAR, o que também poderá ser um problema na caracterização das estirpes BLPACR (Tristram *et al.*, 2007; Kubota *et al.*, 2006).

Analisaram-se duas estirpes produtoras de β -lactamase (BLPAR e BLPACR) que apresentavam uma CIM para o co-amoxiclave de 4 mg/L, ou seja, que estavam no limiar entre a suscetibilidade e resistência a este antibiótico. Segundo Matic e colaboradores (2003), a diminuição da suscetibilidade ao co-amoxiclave em estirpes BLPACR poderá ser

devida a mutações no gene *ftsI*, uma vez que esta resistência também foi descrita em estirpes BLNAR. Das estirpes mencionadas anteriormente, uma delas tinha fenótipo BLPAR com uma CIM=4mg/L, e como estas estirpes não apresentam substituições aminoacídicas, questiona-se a veracidade da afirmação anterior, sendo necessário de futuro aprofundar esta questão. Foram ainda detetadas duas estirpes BLNAR resistentes ao co-amoxiclave (CIM≥4mg/L) e vinte e quatro estirpes com uma CIM=4mg/L, em que todas elas têm em comum a substituição Asn526Lys (incluindo a estirpe BLPACR), e apresentam com grande frequência as substituições Asp350Asn, Ala502Thr, Val547Ile e Asn569Ser. As primeiras substituições mencionadas são conhecidas por estarem associadas à resistência à ampicilina (Tristram *et al.*, 2007), mas desconhece-se a influência das duas últimas substituições mencionadas, na resistência aos antibióticos β-lactâmicos. Tendo em conta os resultados obtidos, presume-se que a substituição Asn526Lys tenha alguma influência não só sobre a resistência à ampicilina, mas como também ao co-amoxiclave.

No que diz respeito às cefalosporinas de 2ª geração (cefuroxima e cefaclor) e às estirpes produtoras de β-lactamase, foram caracterizadas quatro estirpes resistentes ao cefaclor, sendo uma delas gBLPAR e três pertencentes ao genótipo gBLPACR, e destas, todas são resistentes ao SXT. Segundo a literatura descrita, a tripla substituição Met377Ile, Ser385Thr e Leu389Phe, e ainda as substituições Arg517His, Asn526Lys, Val547Ile, Asn569Ser contribuem substancialmente para o aumento da resistência às cefalosporinas (Osaki *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2010). Straker e seus colaboradores (2003) descreveram também a importância que a substituição Ser357Asn tem na resistência à cefuroxima, contribuindo grandemente para a mesma. Tendo em conta que estas estirpes BLPAR não apresentam substituições aminoacídicas, questiona-se até que ponto a produção de β-lactamase poderá ou não contribuir para a resistência ao cefaclor. No caso das estirpes BLPACR, não foi detetado nenhum padrão mutacional comum, mas uma das estirpes apresentava a substituição Val547Ile, outra estirpe a substituição Leu456Val, e a última apresentava um conjunto de três substituições: Asp350Asn, Asn526Lys e Val547Ile (estirpe de serótipo f). Não se conseguiu estabelecer uma relação aparente entre estas substituições e a resistência ao cefaclor, mas persiste a questão da influência do tipo de β-lactamase (neste caso TEM-1), e a influência que o serótipo possa ter na resistência a este antibiótico. Das estirpes BLNAR, foram caracterizadas oito estirpes resistentes à cefuroxima (das quais 4 pertencem ao grupo III-like) e vinte e cinco estirpes resistentes ao cefaclor (uma pertence ao grupo III-like). As substituições comuns a estas estirpes na resistência a ambos os antibióticos são a Asp350Asn, Ala502Thr, Asn526Lys, Val547Ile (e Asn569Ser no caso do cefaclor), e no caso das estirpes pertencentes ao grupo III-like, as substituições são Asp350Asn, Ser357Asn, Met377Ile, Ser385Thr, Arg517His, Thr532Ser, Val547Ile, e ainda as substituições Leu389Phe e Asn569Ser no caso do cefaclor. Os dados obtidos são suportados na sua maioria pela literatura existente, mas tendo em conta que não existe atualmente informação suficiente sobre o efeito das substituições Val547Ile e Asn569Ser na resistência

aos antibióticos, pensa-se que as estirpes com estas substituições poderão ter alguma associação quanto à resistência ao cefaclor.

As cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (cefotaxima e cefepime) apresentaram uma boa atividade *in vitro* contra as estirpes em estudo, de tal forma, que apenas uma estirpe BLNAR se mostrou resistente, e apenas ao cefepime. Duas outras estirpes (BLNAR e BLPACR) apresentaram valores que estavam no limiar entre a suscetibilidade e resistência a este antibiótico (CIM=2 mg/L). Todas as estirpes apresentaram padrões mutacionais diferentes, sendo que a estirpe resistente apresentou três substituições Asp350Asn, Val547Ile e Asn569Ser, e as duas primeiras substituições eram comuns às outras duas estirpes. Tendo sido analisado o conjunto de estirpes constituintes da base de dados deste estudo, com estas substituições, assumiu-se que estas poderão ter influência na resistência à cefepime, mas não será este o fator determinante.

Segundo Sanbongi e seus colaboradores (2006), a resistência ao imipenem e ao meropenem pode ser afetada pela substituição Asn526Lys e outras adicionais, mas raramente influenciada pela substituição Arg517His. Cerquetti e colaboradores (2007), consideraram que substituições adicionais como a Ala502Val, Gly490Glu, Met377Ile, Val547Ile e Asn569Ser poderão ter influência na resistência aos carbapenems. Apenas 4 das estirpes em estudo apresentam resistência ao meropenem (CIM \geq 1mg/L), sendo todas de genótipo gBLNAR, resistentes ao SXT, e apresentaram o mesmo padrão mutacional: Asp350Asn, Ala502Val, Asn526Lys, Val547Ile e Asn569Ser. Os dados obtidos neste estudo não comprovam a existência de uma relação de associação entre as substituições encontradas com a resistência ao meropenem, mas no entanto, estas poderão ter influência nesta resistência.

Foi detetada uma estirpe de genótipo gBLNAS resistente à rifampicina; tendo em conta que estas estirpes não apresentam alterações nas PBP3, uma possível razão para esta ocorrência poderá ser a transferência horizontal de informação genética entre estirpes e/ou espécies relacionadas entre si, ou ainda por recombinação homóloga (Tahakata *et al.*, 2007).

4.5 Evolução dos mecanismos de resistência em estirpes clínicas de *H. influenzae* aos antibióticos β -lactâmicos

A epidemiologia das estirpes *H. Influenzae* sofreu alterações em Portugal ao longo dos dois períodos estudados, 2001-2008 e 2009-2012. Houve um aumento relativo do número de estirpes não produtoras de β -lactamase (de 160 para 182), e destas, houve um aumento substancial de estirpes BLNAR (de 94 para 160), diminuindo assim a frequência das estirpes suscetíveis (BLNAS). Também as estirpes produtoras de β -lactamase sofreram algumas alterações na sua incidência, nomeadamente as gBLPAR (de 33 para 22) e gBLPACR (de 47 para 44). A introdução da vacina conjugada para o Hib e a emergência das estirpes não produtoras de β -lactamase e resistentes aos β -lactâmicos, que apresentam substituições

aminoacídicas nas PBPs, poderão ter contribuído significativamente para as alterações que se têm vindo a sentir nos últimos anos.

No que concerne à pesquisa de cápsula, manteve-se estável a prevalências das estirpes não capsuladas, aumentando no entanto o número de estirpes capsuladas de serótipo não-b (de 1 para 10). Esta diferença pode ser justificada pela introdução da vacina Hib, que conforme descrito acima, reduziu a incidência de estirpes Hib, aumentando a prevalência de estirpes NC e de serótipo não-b.

As taxas de resistência para os sete antibióticos β -lactâmicos testados no presente estudo demonstraram que houve uma diminuição generalizada da resistência associada aos mesmos, entre os dois períodos estudados, com exceção das estirpes BLNAR pertencentes ao grupo III-*like*.

A suscetibilidade das estirpes às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (cefotaxima e cefepime) aumentou no período de 2009-2012, ou seja, estes antibióticos continuam a apresentar uma boa atividade *in vitro* contra as estirpes, independentemente destas apresentarem ou não alterações ao nível das PBP3s e da produção ou não de β -lactamases.

É notável também um aumento considerável da suscetibilidade aos antibióticos co-amoxiclave e meropenem entre os dois períodos considerados (2001/2008 e 2009/2012), havendo apenas uma pequena percentagem de estirpes BLNAR que apresentaram resistência a ambos os antibióticos. Tendo em conta o que foi referido na secção anterior, a resistência tanto ao co-amoxiclave como ao meropenem poderá ser influenciada por alterações das PBP3s. A diminuição dos valores de resistência ao co-amoxiclave e ao meropenem poderá estar associada a alterações da prescrição de antibióticos que é normalmente utilizada (Dabernat&Delmas, 2012; Barbosa *et al.*, 2011), e no que diz respeito ao co-amoxiclave nas estirpes produtoras de β -lactamase, há que ter em conta que houve uma diminuição do seu número de um período para o outro (2001/2008: 80; 2009/2012: 66), e como tal, considera-se que o aumento da suscetibilidade a este antibiótico, seja devido ao seu efeito que este possa ter sobre as mesmas.

A ampicilina e as cefalosporinas de 2^a geração continuam a ser os antibióticos aos quais as estirpes apresentam maior resistência. As estirpes produtoras de β -lactamase comparativamente às estirpes não produtoras de β -lactamase prevalecem quanto à resistência à ampicilina, isto considerando que esta é limitada ao mecanismo enzimático. Houve na realidade uma diminuição dos valores de resistência à ampicilina nas estirpes BLNAR e BLNAS entre os dois períodos considerados, e também nos valores de resistência às cefalosporinas de 2^a geração, com exceção das estirpes BLNAR III-*like*. Pressupõe-se que a alteração da prescrição de antibióticos juntamente com as alterações no consumo dos mesmos poderá ter tido influência nesta diminuição de resistência. A resistência à cefuroxima apenas foi detetada nas estirpes BLNAR, e especialmente nas estirpes do grupo III-*like*. O aumento relativo destas estirpes entre os dois períodos e a redução de

suscetibilidade a este antibiótico são resultados que são suportados pela literatura existente (Straker *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2010).

A análise das substituições aminoacídicas e dos padrões mutacionais resultantes dos dois períodos mostrou que houve alterações ao nível dos genótipos de resistência das estirpes entre os dois períodos considerados. Houve um aumento do número total de padrões mutacionais analisados entre este período, e curiosamente, foi detetado, entre os dois períodos, e em cada grupo mutacional, uma grande diversidade de padrões mutacionais. Como exemplo, temos os padrões de mutações detetados para o grupo I no período 2001-2008 que são completamente diferentes dos padrões analisados no período 2009-2012. Esta diversidade de padrões parece aumentar paralelamente com o aumento da prevalência das estirpes BLNAR, contrariamente às estirpes BLPACR, que apresentaram nitidamente uma menor diversidade mutacional. Segundo Dabernat e Delmas (2012), uma vez que as substituições aminoacídicas resultam de mutações pontuais, existe um grande potencial para uma diversidade elevada, sendo assim esperado que o número de padrões também aumente, e conseqüentemente surjam estirpes de resistência elevada a antibióticos.

Entre os dois períodos estudados, houve um aumento das estirpes BLNAR e uma diminuição considerável das estirpes BLPACR nos grupos IIb e IIc. O aumento significativo do número de estirpes BLNAR, associado à heterogeneidade genética característica das mesmas, suporta claramente a ideia da complexidade da dinâmica que existe entre a evolução da resistência aos antibióticos, que é multifactorial, e a pressão seletiva exercida por cada antibiótico, que pode variar entre países e/ou regiões geográficas. A diminuição que se verificou no número de estirpes produtoras de β -lactamase entre os dois períodos considerados influenciou com certeza os resultados obtidos no que diz respeito à frequência de isolados no grupo mutacional IIb. Já a frequência de estirpes do grupo IIc manteve-se relativamente estável desde 2001. Com estes resultados, observou-se que as estirpes BLPACR apresentaram uma evolução molecular muito mais lenta que as estirpes BLNAR. As estirpes BLNAR, durante os dois períodos, demonstraram nitidamente uma maior diversidade genética, que se traduziu na variedade de padrões mutacionais apresentada, e também no aumento do número de substituições aminoacídicas em cada padrão analisado.

4.6 Natureza filogenética dos genótipos gBLNAR e gBLPACR

Vários estudos demonstraram que as estirpes BLNAR apresentam uma grande diversidade fenotípica e genotípica com uma ausência generalizada de disseminação clonal (Tristram *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2011). Sevillano e colaboradores (2009) mostraram que as estirpes BLPACR apresentam relações filogenéticas mais próximas entre si quando comparadas com as estirpes BLNAR, apresentando inclusive padrões mutacionais iguais.

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que não existiu verdadeiramente uma proximidade genética entre as estirpes BLNAR, embora se tenham formado pequenos *clusters*. As estirpes BLPACR analisadas, contrariamente ao que está descrito, não demonstraram apresentar relações filogenéticas muito próximas entre si, uma vez que estirpes de grupos e padrões mutacionais idênticos encontravam-se distantes a nível filogenético.

A β -lactamase é geralmente transportada por um plasmídeo, e sendo assim, não é surpreendente que diferentes STs, quer produzam ou não β -lactamase, estejam presentes no mesmo complexo clonal. Exemplo disso é o caso do “grupos clonais” constituídos pelo STX e ST396, e ST422 e ST14, que estão relacionados entre si, mas são diferentes no que diz respeito à produção de β -lactamase.

As estirpes BLNAR e BLPACR dos grupos mutacionais IIb e IIc estão dispersos pelo dendograma, sugerindo por si que existe alguma heterogeneidade genética, ainda que haja pequenos *clusters*, e estes apresentem padrões mutacionais idênticos entre si. Segundo Takahata e colaboradores (2007), esta situação pode ser justificada se considerarmos a possibilidade de ocorrência de transferências genéticas do gene *ftsI* em *H. influenzae* entre estirpes ou outras espécies relacionadas. A evolução destas estirpes, especialmente as BLNAR, poderá ser explicada tendo por base duas hipóteses, por mutações pontuais no gene *ftsI* devido à pressão seletiva dos antibióticos, ou por recombinação homóloga com espécies relacionadas (Barbosa *et al.*, 2011; Takahata *et al.*, 2007).

O estudo de filogenia das estirpes BLNAR e BLPACR apresenta algumas limitações, nomeadamente o número reduzido de isolados clínicos analisados. Um estudo mais aprofundado, que inclua um número maior de estirpes (BLNAR e BLPACR), com padrões mutacionais diferentes, capsuladas e não capsuladas, poderá ajudar a melhorar o conhecimento que se tem da biologia e epidemiologia das estirpes HiNC, de desenvolver estratégias de prevenção e no estabelecimento de terapêuticas adequadas no tratamento de infeções provocadas por *H. Influenzae*, de forma a evitar a disseminação destas estirpes.

Considerações Finais

A introdução da vacina conjugada para o Hib no Plano Nacional de Vacinação em Portugal, provocou alterações na epidemiologia de *Haemophilus influenzae* e na sua evolução relativamente à resistência aos antibióticos. A incidência das estirpes produtoras de β -lactamase tem vindo a diminuir ao longo dos anos, contrariamente às estirpes não produtoras, que além de apresentarem uma maior prevalência, possuem uma grande diversidade genética que lhes favorece de alguma forma a sua capacidade de resistência aos antibióticos e disseminação clonal. Os valores dos genótipos de resistência, tal como os de

suscetibilidade aos antibióticos obtidos neste estudo foram muito semelhantes aos valores existentes em outros países, nomeadamente em França, Espanha, Canadá ou Japão.

Os elevados valores de suscetibilidade aos antibióticos por *H. influenzae* em Portugal, sugerem que o tratamento antibiótico empírico utilizado poderá até ser bastante adequado tendo em conta o tipo de infeção. No entanto, à medida que o conhecimento farmacocinético e farmacodinâmico se vai expandindo, será eventualmente possível aperfeiçoar as recomendações ao nível da terapêutica. A vigilância contínua destes agentes patogénicos é no entanto essencial para o estabelecimento de medidas de controlo e prevenção de infeções, e ainda na monitorização da evolução de doenças invasivas provocadas pela emergência das estirpes HiNC.

A deteção de estirpes BLNAR com suscetibilidade reduzida aos antibióticos β -lactâmicos continua a ser uma questão controversa. A definição atual do CLSI de estirpes BLNAR consiste na não produção de β -lactamase associada a uma CIM \geq 4mg/L, mas estas *guidelines* por si só, não permitem que seja feita uma caracterização destas estirpes, como suscetíveis ou resistentes, aplicando apenas os testes de suscetibilidade utilizados na rotina de um laboratório clínico. As estirpes BLNAR deste estudo foram caracterizadas por técnicas moleculares específicas e morosas, e só através destas foi possível caracterizar as estirpes BLNAR a nível genético (deteção de mutações). Com isto, realça-se a importância de se definirem *breakpoints* e metodologias apropriadas e eficazes, no sentido de melhorar a definição e deteção destas estirpes. Adicionalmente, não existe uma definição clara das estirpes BLPACR, e é desconhecida a sua importância clínica. São definidas pela sua resistência à ampicilina pela produção de β -lactamase, e por possuírem ainda um outro mecanismo de resistência. A deteção destas estirpes é realizada também de acordo com o método descrito anteriormente para as estirpes BLNAR, e é crucial que haja um desenvolvimento de novos meios de diagnóstico na sua deteção.

Um outro aspeto a ser considerado seria o de aprofundar conhecimentos sobre a interação desta espécie com o hospedeiro, com o objetivo de caracterizar e monitorizar a evolução da resistência aos antibióticos por estas estirpes para que possa haver uma melhoria na eficácia na terapia antibiótica aplicada.

Este estudo contribuiu para a caracterização dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em estirpes clínicas de *H. influenzae*, e para a monitorização e vigilância epidemiológica desta espécie em Portugal. Este trabalho de investigação contribuiu ainda para o desenvolvimento de conhecimento científico nesta área em Portugal.

Referências

- Bae, S., Lee, J., Lee, J., Kim, E., Lee, S., Yu, J. & Kang, Y. (2010). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a Nationwide Acute Respiratory Infections Surveillance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (1), 65-71.
- Bajanca, P., Caniça, M. & The Multicentre Study Group. (2004). Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2), 807-810.
- Bajanca-Lavado, M.P., Casin, I., Vaz Pato, M.V. & The Multicentre Study Group. (1996). Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38, 615-625.
- Barbosa, A.R., Giufrè, M., Cerquetti, M. & Bajanca-Lavado, P. (2011). Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 788–796.
- Bush, K. (1988). B-lactamase Inhibitors from Laboratory to Clinic. *Clinical Microbiology Reviews*, 1 (1), 109-123.
- Byarugaba, D.K. (2010). Mechanisms of antimicrobial resistance. In A.J. de Sosa, D.K. Byarugaba, C.F. Amábile-Cuevas, P.R. Hsueh, S. Kariuki & I.N. Okeke (Eds.), *Antimicrobial Resistance in Developing Countries* (15-26), Springer Science + Business Media, Hardcover.
- Campos *et al.* (2004). Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae* Infections after Extensive Vaccination against *H. influenzae* type b. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2), 524-529.
- Centers for Disease Control and Prevention/National Center for Immunization and Respiratory Diseases (2012). *Haemophilus influenzae* type b, Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases. In CDC/NCIRD (Eds.) the pink book: course textbook (12th Revised Edition) (87-99). CDC.
- Cerquetti, M., Giufrè, M., Cardines, R. & Mastrantonio, P. (2007). First characterization of Heterogeneous Resistance to Imipenem in Invasive Nontypeable *Haemophilus influenzae* Isolates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51 (9), 3155-3161.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, 32 (3), 96-99.
- Dabernat, H. & Delmas, C. (2012). Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 2745-2753.

- Dabernat, H., *et al.* (2002). Diversity of β -Lactam Resistance-Confering Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (7), 2208-2218.
- Drawz, S. M. & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23 (1), 160-201.
- Eliopoulos, G.M. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Antimicrobial Resistance*, 32, 1608-1613.
- Falla, T.J., Crook, D.W., Brophy L.N., Maskell, D., Kroll, J.S. & Moxon E.R. (1994). PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (10), 2382-2386.
- Farrell, D.J., Morrissey, I., Bakker, S., Buckridge, S. & Felmingham, D. (2005). Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 773-776.
- Fleischmann, R. D. *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 492-512.
- Fluit, A.C., Florijn, A., Verhoef, J. & Milatovic D. (2005). Susceptibility of European β -lactamasepositive and β -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 133-138.
- Garcia-Cobos, S., *et al.* (2008). Low β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (7), 2407-2414.
- Garcia-Cobos, S., *et al.* (2007). Ampicillin-Resistant Non- β -Lactamase-Producing *Haemophilus influenzae* in Spain: Recent Emergence of Clonal Isolates with Increased Resistance to Cefotaxime and Cefixime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (7), 2564-2573.
- Geme III, J.W.St. & Falkow, S. (1991). Loss of Capsule Expression by *Haemophilus influenzae* Type b Results in Enhanced Adherence to and Invasion of Human Cells. *Infection and Immunity*, 59 (4), 1325-1333.
- Georgopapadakou, N.H. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37 (10), 2045-2053.
- Gomez-de-Leon, P., *et al.* (2000). Genomic Variability of *Haemophilus influenzae* Isolated from Mexican Children Determined by Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (7), 2504-2511.
- Gutman, L., Williamson, R., Collatz, E. & Acar, J.F. (1988). Mechanisms of Beta-Lactam Resistance in *Haemophilus influenzae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7 (5), 610-615.

- Hamilton-Miller, J.M.T. (1999). B-lactams: variations on a chemical theme, with some surprising biological results. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 729-734.
- Hasegawa, K., *et al.* (2006). High prevalence of type b β -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 1077-1082.
- Hasegawa, K., *et al.* (2003). Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9 (1), 39-46.
- Javier-Zepeda, C. (1999). Bacteriologia Clinica de *Haemophilus Influenzae*. *Honduras Pediatrica*, 20 (3), 81-82.
- Kaczmarek, F.S., Gootz, T.D., Dib-Hajj, F., Shang, W., Hallowell, S. & Cronan, M. (2004). Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (5), 1630-1639.
- Karlowsky, J.A., Verma, G., Zhanel, G.G. & Hoban, D.J. (2000). Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 871-875.
- Kärpänoja, P. *et al.* (2008). Connection between Trimethoprim-Sulfamethoxazole, Use and Resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (7), 2480-2485.
- Kärpänoja, P. *et al.* (2004). Disc diffusion susceptibility testing of *Haemophilus influenzae* by NCCLS methodology using low-strength ampicillin and co-amoxiclav discs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 660-663.
- Kaur, R., Chang A., Xu Q., Casey J.R. & Pichichero M.E. (2011) Phylogenetic relatedness and diversity of nontypable *Haemophilus influenzae* in the nasopharynx and middle ear fluid of children with acute otitis media. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1841-1848.
- Kim *et al.* (2007). Diversity of Ampicillin Resistance Genes and Antimicrobial Susceptibility Patterns in *Haemophilus influenzae* Strains Isolated in Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2), 453-460.
- Kishii *et al.* (2010). Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *Journal of Infections and Chemotherapy*, 16, 87-93.
- Kostyanev, T.S. & Sechanova, L.P. (2012). Virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *Folia Medica*, 54 (1), 19-23.
- Kroll, J.S. & Moxon, E.R. (1988). Capsulation and gene Copy Number at the *cap* Locus of *Haemophilus influenzae* Type b. *Journal of Bacteriology*, 170 (2), 859-864.

- Kubota *et al.* (2006). Genetic Analyses of Beta-Lactamase Negative Ampicillin-Resistant Strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 59, 36-41.
- Ladhani, S., *et al.* (2010). Invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 1996-2006. *Emerging Infectious Diseases*, 16 (3), 455-463.
- Meats, E., *et al.* (2003). Characterization of Encapsulated and Nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by *Multilocus Sequence Typing*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (4), 1623-1636.
- Mendonça, N., Ferreira, E. & Caniça M. (2006). Occurrence of a novel SHV-type enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum beta-lactamase-producing evaluation. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 56 (4), 415-420.
- Musser, J.M., Barenkamp S.J., Granoff, D.M. & Selander R.K. (1986). Genetic Relationships of Serologically Nontypable and Serotype b Strains of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 52 (1), 183-191.
- Needham, C.A. (1988). *Haemophilus influenzae*: Antibiotic Suscetibility. *Clinical Microbiology Reviews*, 1 (2), 218-227.
- Nizet, V., Colina, K.F., Almquist, J.R., Rubens, C.E. & Smith, A.L. (1996). A Virulent Nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 173, 180-186.
- Osaki *et al.* (2005). Genetic Approach to Study the Relationship between Penicillin-Binding Protein 3 Mutations and *Haemophilus influenzae* β -Lactam Resistance by Using Site-Directed Mutagenesis and Gene Recombinants. *Microbial Agents and Chemotherapy*, 49 (7), 2834-2839.
- Parr, T.R. & Bryan, L.E. (1984). Mechanism of Resistance of an Ampicillin-Resistant, β -Lactamase-Negative Clinical Isolate of *Haemophilus influenzae* Type b to β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25 (6), 747-753.
- Pittman, M. (1931). Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Experimental Medicine*, 53,471-492.
- Rahman, A. N. (2008). Comparison of Virulence Determinants of Different Strains of *Haemophilus influenzae*. Acedido a 17 Junho, 2013, em <http://www.heratonline.com/health/Comparison%20of%20Virulence%20Determinants%20of%20Different.pdf>
- Roberts, M., Stull, T. L. & Smith, A. L. (1981). Comparative Virulence of *Haemophilus influenzae* with a Type b or Type d Capsule. *Infection and Immunity*, 32 (2), 518-524.
- Russell, A., & Chopra, I. (1990). *Understanding Antibacterial Action and Resistance*. Ellis Horwood, NY.

- Sanbongi, Y., Suzuki, T., Osaki, Y., Senju, N., Ida, T. & Ubukata, K. (2006). Molecular evolution of β -lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (7), 2487-2492.
- Satola, S.W., Collins, J.T., Napier, R. & Farley, M.M. (2007). Capsule Gene Analysis of Invasive *Haemophilus influenzae*: Accuracy of Serotyping and Prevalence of IS1016 among Nontypeable Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (10), 3230-3238.
- Satola, S.W., Schirmer, P.L. & Farley, M.M. (2003). Genetic Analysis of the Capsule Locus of *Haemophilus influenzae* Serotype f. *Infection and Immunity*, 71 (12), 7202-7207.
- Schleifer, K.H. & Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36 (4), 407-477.
- Sevillano *et al.* (2009). Genotypic versus Phenotypic Characterization, with Respect to β -Lactam Susceptibility, of *Haemophilus influenzae* Isolates Exhibiting Decreased Susceptibility to β -Lactam Resistance Markers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (1), 267-270.
- Shuel, M.L. & Tsang, R.S.W. (2009). Canadian β -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* isolates showing decreased susceptibility toward ampicillin have significant penicillin binding protein 3 mutations. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63, 379-383.
- Silhavy, T.J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a000414
- Sill, M.L. & Tsang, R.S.W. (2008). Antibiotic Susceptibility of Invasive *Haemophilus influenzae* Strains in Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (4), 1551-1552.
- Skaare, D. *et al.* (2009). Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein-mediated β -lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clinical Microbiology and Infections*, 16, 1117-1124.
- Slack, M.P.E. (2007). *Haemophilus*. In D. Greenwood, R.C.B. Slack, W. Irving & M.R. Barer (Eds.), *Medical Microbiology, A guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control*. (17th Revised Edition) (318-324). Churchill Livingstone.
- Smith-Vaughan, H.C., Sriprakash, K.S., Leach, A.J., Mathews, J.D. & Kemp, D.J. (1998). Low genetic diversity of *Haemophilus influenzae* type b compared to nonencapsulated *H. influenzae* in a population in which *H. influenzae* is highly endemic. *Infection and Immunity*, 66 (7), 3403-3409.
- Straker *et al.* (2003). Cefuroxime resistance in non- β -lactamase *Haemophilus influenzae* is linked to mutations in *ftsI*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 523-530.
- Tahakata, S. *et al.* (2007). Horizontal Gene Transfer of *ftsI*, Encoding Penicillin-Binding Protein 3, in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (5), 1589-1595.

- Taubenberger, J. K., Hultin, J.V. & Morens D. M. (2007). Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context. *Antiviral Therapy*, 12 (4), 581-591.
- Tristram, S.G., Jacobs, M.R. & Appelbaum, P.C. (2007). Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (2), 368-389.
- Tristram, S.G., Littlejohn, R. & Bradbury, R.S. (2010). *bla*_{ROB-1} Presence on pB1000 in *Haemophilus influenzae* Is Widespread, and Variable Cefaclor Resistance Is Associated with Altered Penicillin-Binding Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (11), 4945-4947.
- Ubukata, K., *et al.* (2001). Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45 (6), 1693-1699.
- Ulanova, M. & Tsang, R.S.W. (2009). Invasive *Haemophilus influenzae* disease: Changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century. *Infection, Genetics and Evolution*, 9, 594-605.
- Ulanova, M. (2013). Global Epidemiology of Invasive *Haemophilus influenzae* Type a Disease: Do We Need a New Vaccine? *Journal of Vaccines*. Acedido a 27 de Junho, 2013, em <http://dx.doi.org/10.1155/2013/941461>
- Winslow, E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede Jr., C., Rogers, L. A. & Smith, G. H. (1917). The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of Bacteriology*, 2 (5), 505 – 566.
- Witherden, E.A., Montgomery, J. Henderson, B. & Tristram, S.G. (2011). Prevalence and genotypic characteristics of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1013-1015.
- World Health Organization (2011). *Haemophilus influenzae* type b (Hib). WHO site. Acedido a 15 de Julho, 2013 em http://www.who.int/immunization_delivery/new_vaccines/hib/en/index.html
- Zapun, A., Contreras-Martel, C. & Vernet, T. (2008). Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiological Review*, 32, 361-385.
- Zwahlen, A., Winkelstein, J.A. & Moxon, E.R. (1983). Surface determinants of *Haemophilus influenzae* pathogenicity: comparative virulence of capsular transformants in normal and complement-depleted rats. *Journal of Infectious Diseases*, 148 (3), 385-394.

Anexos

ANEXO I

Anexo I - Sequências de *primers* utilizados para amplificação da região específica da cápsula (Falla *et al.* 1994), dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{ROB} (Mendonça *et al.*, 2006) e os tamanhos dos produtos esperados.

Primers	Sequência nucleotídica	PCR em que são utilizados	Tamanho (pb)
Cap Hi1	5' CGT TTG TAT GAT GTT GAT CCA GAC 3'	Pesquisa do gene <i>bexA</i>	345
Cap Hi2	5' TGT CCA TGT CTT CAA AAT GAT G 3'	Pesquisa do gene <i>bexA</i>	
Cap Hia1	5' CTA CTC ATT GCA GCA TTT GC 3'	Caracterização do serótipo a	250
Cap Hia2	5' GAA TAT GAC CTG ATC TTC TG 3'	Caracterização do serótipo a	
Cap Hib1	5' GCG AAA GTG AAC TCT TAT CTC TC 3'	Caracterização do serótipo b	480
Cap Hib2	5' GCT TAC GCT TCT ATC TCG GTG AA 3'	Caracterização do serótipo b	
Cap Hic1	5' TCT GTG TAG ATG ATG GTT CA 3'	Caracterização do serótipo c	250
Cap Hic2	5' CAG AGG CAA GCT ATT AGT GA 3'	Caracterização do serótipo c	
Cap Hid1	5' TGA TGA CCG ATA CAA CCT GT 3'	Caracterização do serótipo d	150
Cap Hid2	5' TCC ACT CTT CAA ACC ATT CT 3'	Caracterização do serótipo d	
Cap Hie1	5' GGT AAC GAA TGT AGT GGT AG 3'	Caracterização do serótipo e	1350
Cap Hie2	5' GCT TTA CTG TAT AAG TCT AG 3'	Caracterização do serótipo e	
Cap Hif1	5' GCT ACT ATC AAG TCC AAA TC 3'	Caracterização do serótipo f	450
Cap Hif2	5' CGC AAT TAT GGA AGA AAG CT 3'	Caracterização do serótipo f	
TEM-1 F	5' TGG GTG CAC GAG TGG GTT AC 3'	Pesquisa do gene <i>bla</i> _{TEM-1}	526
TEM-1 R	5' TTA TCC GCC TCC ATC CAG TC 3'	Pesquisa do gene <i>bla</i> _{TEM-1}	
ROB-1 F	5' ATC AGC CAC ACA AGC CAC CT 3'	Pesquisa do gene <i>bla</i> _{ROB-1}	692
ROB-1 R	5' GTT TGC GAT TTG GTA TGC GA 3'	Pesquisa do gene <i>bla</i> _{ROB-1}	

ANEXO II

Anexo II - Sequências de *primers* utilizados para amplificação e sequenciação do gene *ftsI* (Cerquetti *et al.*, 2007).

Primers	Sequência nucleotídica	PCR em que são utilizados
<i>ftsI rev</i>	5' CTG GAT AAT TCT GTC TCA GA 3'	Pesquisa do gene <i>ftsI</i> – amplificação/sequenciação
<i>ftsI frw</i>	5' GAC GAT TTG GAT AAC CCA TA 3'	Pesquisa do gene <i>ftsI</i> – amplificação
<i>ftsI inrev</i>	5' TAG AAA GCG GGC GAT AAA CAC C 3'	Pesquisa do gene <i>ftsI</i> – sequenciação

ANEXO III

Anexo III - Nomenclatura dos 20 aminoácidos essenciais. (www.wikipedia.pt)

Nome	Símbolo	Abrev.	Nomenclatura
Glicina	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético ou Ácido 2-amino-etanóico
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico ou Ácido 2-amino-propanóico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico ou Ácido 2-amino-4-metil-pentanóico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico ou Ácido 2-amino-3-metil-butanóico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico ou ácido 2-amino-3-metil-pentanóico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe, Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propilônico ou Ácido 2-amino-3-fenil-propanóico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propilônico ou Ácido 2-amino-3-hidroxi-propanóico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propilônico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propilônico ou paraidroxifenilalanina
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Ácido aspártico	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico ou Ácido 2-amino-butanodióico
Ácido Glutâmico	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico ou Ácido 2, 6-diaminoexanóico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropilônico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropilônico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico

ANEXO IV

Anexo IV - Sequências de *primers* utilizados para amplificação da região específica dos 7 genes bem conservados em *H. influenzae* (Meats *et al.* 2003) e os tamanhos dos produtos esperados. (**Nota:** As sequências M13 estão sublinhadas).

Primers	Sequência nucleotídica	Tamanho (pb)
adK-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> GGT GCA CCG GGT GCA GGT AA-3'	477
adK-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> CCT AAG ATT TTA TCT AAC TC -3'	
atpG-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> ATG GCA GGT GCA AAA GAG AT-3'	447
atpG-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> TTG TAC AAC AGG CTT TTG CG -3'	
frdB-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> CTT ATC GTT GGT CTT GCC GT-3'	489
frdB-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> TTG GCA CTT TCC ACT TTT CC -3'	
fucK-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> ACC ACT TTC GGC GTG GAT GG-3'	345
fucK-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> AAG ATT TCC CAG GTG CCA GA -3'	
mdh-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> TCA TTG TAT GAT ATT GCC CC-3'	405
mdh-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> ACT TCT GTA CCT GCA TTT TG-3'	
pgi-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> GGT GAA AAA ATC AAT CGT AC-3'	468
pgi-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> ATT GAA AGA CCA ATA GCT GA -3'	
recA-M13 F	5'- <u>TGT AAA ACG ACG GCC AGT</u> ATG GCA ACT CAA GAA GAA AA-3'	426
recA-M13 R	5'- <u>CAG GAA ACA GCT ATG ACC</u> TTA CCA AAC ATC ACG CCT AT -3'	

ANEXO V

Anexo V - Suscetibilidade das estirpes clínicas (total) de *H. influenzae* aos antibióticos em estudo, de acordo com o genótipo de resistência e breakpoints do CLSI (2012).

Antibiótico	Genótipo de Resistência	MIC (µg/ml)			Suscetibilidade (% isolados)				P value
		50%	90%	Range	S	I	R	NS	
Ampicilina	gBLNAS (22)	0,12	1	≤0,03 – 2	95,5	4,5	0,0	-	0,000
	gBLPAR (22)	> 8	> 8	8 -> 8	0,0	0,0	100,0	-	
	gBLNAR (160)	1	2	≤0,03 – 4	76,9	20,0	3,1	-	
	gBLPACR (44)	> 8	> 8	8 -> 8	0,0	0,0	100,0	-	
Co-amoxiclave	gBLNAS (22)	≤ 0,25	1	≤ 0,25 - 2	100,0	-	0,0	-	Ns
	gBLPAR (22)	1	2	0,5 - 4	100,0	-	0,0	-	
	gBLNAR (160)	2	4	≤ 0,25 -> 4	98,8	-	1,2	-	
	gBLPACR (44)	2	2	0,5 - 4	100,0	-	0,0	-	
Cefotaxima (3ª ger.)	gBLNAS (22)	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03 – 0,06	100,0	-	-	0,0	Ns
	gBLPAR (22)	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	100,0	-	-	0,0	
	gBLNAR (160)	0,06	0,12	≤ 0,03 - 1	100,0	-	-	0,0	
	gBLPACR (44)	≤ 0,03	0,06	≤ 0,03 – 0,25	100,0	-	-	0,0	
Cefepime (4ª ger.)	gBLNAS (22)	≤ 0,12	0,25	≤ 0,12 – 0,25	100,0	-	-	0,0	Ns
	gBLPAR (22)	≤ 0,12	≤ 0,12	≤ 0,12 – 0,25	100,0	-	-	0,0	
	gBLNAR (160)	0,25	0,5	≤ 0,12 -> 2	99,4	-	-	0,6 ^a	
	gBLPACR (44)	≤ 0,12	0,25	≤ 0,12 – 2	100,0	-	-	0,0	
Cefuroxima (2ª ger.)	gBLNAS (22)	0,5	4	≤ 0,25 - 4	100,0	0,0	0,0	-	0,001
	gBLPAR (22)	0,5	1	0,5 – 1	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLNAR (160)	2	8	≤ 0,25 -> 8	78,1	12,5	9,4	-	
	gBLPACR (44)	1	2	≤ 0,25 – 4	100,0	0,0	0,0	-	
Cefaclor (2ª ger.)	gBLNAS (22)	≤ 1	8	≤ 1 - 8	100,0	0,0	0,0	-	0,000
	gBLPAR (22)	8	16	2 -> 16	86,4	9,1	4,5	-	
	gBLNAR (160)	8	> 16	≤ 1 -> 16	55,6	28,8	15,6	-	
	gBLPACR (44)	8	16	≤ 1 -> 16	81,8	11,4	6,8	-	
Meropenem	gBLNAS (22)	≤ 0,06	0,12	≤ 0,06 – 0,25	100,0	-	-	0,0	Ns
	gBLPAR (22)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06 – 0,25	100,0	-	-	0,0	
	gBLNAR (160)	0,12	0,5	≤ 0,06 – 1	97,5	-	-	2,5 ^a	
	gBLPACR (44)	≤ 0,06	0,25	≤ 0,06 – 0,5	100,0	-	-	0,0	
Ciprofloxacina	gBLNAS (22)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100,0	-	-	0,0	Ns
	gBLPAR (22)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100,0	-	-	0,0	
	gBLNAR (160)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06 – 0,5	100,0	-	-	0,0	
	gBLPACR (44)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100,0	-	-	0,0	
Cloranfenicol	gBLNAS (22)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	Ns
	gBLPAR (22)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLNAR (160)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLPACR (44)	≤ 1	≤ 1	≤ 1 - ≤ 2	100,0	0,0	0,0	-	
Tetraciclina	gBLNAS (22)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	Ns
	gBLPAR (22)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLNAR (160)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLPACR (44)	≤ 1	≤ 1	≤ 1 - 4	97,7	2,3	0,0	-	
Trimetoprima-sulfametoxazole	gBLNAS (22)	≤ 0,25	> 2	≤ 0,25 -> 2	72,2	5,6	22,2	-	0,000
	gBLPAR (22)	≤ 0,25	2	≤ 0,25 -> 2	81,8	9,1	9,1	-	
	gBLNAR (160)	> 2	> 2	≤ 0,25 -> 2	43,8	3,8	52,5	-	
	gBLPACR (44)	> 2	> 2	≤ 0,25 -> 2	43,2	0,0	56,8	-	
Rifampicina	gBLNAS (22)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5 -> 2	94,4	0,0	5,6	-	0,016
	gBLPAR (22)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLNAR (160)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5 - 1	100,0	0,0	0,0	-	
	gBLPACR (44)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	100,0	0,0	0,0	-	
Azitromicina	gBLNAS (22)	1	2	0,5 - 2	100,0	-	-	0,0	Ns
	gBLPAR (22)	0,5	1	≤ 0,25 – 2	100,0	-	-	0,0	
	gBLNAR (160)	1	2	≤0,25 - 4	100,0	-	-	0,0	
	gBLPACR (44)	1	2	≤ 0,25 - 2	100,0	-	-	0,0	

S, suscetível; I, intermédio; R, resistente; a Percentagem de estirpes não suscetíveis ao Cefepime e ao Meropenem.

ANEXO VI

Anexo VI - Suscetibilidade das estirpes clínicas (total) de *H. influenzae* aos antibióticos em estudo, de acordo com a cápsula e breakpoints do CLSI (2012).

Antibiótico	Cápsula	MIC (µg/ml)			Suscetibilidade (% isolados)				P value
		50%	90%	Range	S	I	R	NS	
Ampicilina	NC (<i>bla</i> -) (173)	1	2	≤0,03 – 4	78,0	19,1	2,9	-	0,000
	NC (<i>bla</i> +) (65)	> 8	> 8	1 - > 8	0,0	0,0	100,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,25	0,25	0,25	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	> 8	> 8	> 8	0,0	0,0	100,0	-	
Co-amoxiclave	NC (<i>bla</i> -) (173)	2	4	≤ 0,25 -> 4	98,8	-	1,2	-	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	1	2	0,5 - 4	100,0	-	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,25	0,5	≤ 0,25 – 0,5	100,0	-	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	2	2	2	100,0	-	0,0	-	
Cefotaxima	NC (<i>bla</i> -) (173)	0,06	0,12	≤ 0,03 – 1	100,0	-	-	0,0	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03 – 0,12	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 0,03	≤ 0,03	≤ 0,03	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	0,25	0,25	0,25	100,0	-	-	0,0	
Cefepime	NC (<i>bla</i> -) (173)	0,25	0,5	≤ 0,12 – 2	100,0	-	-	0,0	0,000
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 0,12	0,25	≤ 0,12 – 0,5	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 0,12	> 2	≤ 0,12 -> 2	66,7	-	-	33,3 ^a	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	2	2	2	100,0	-	-	0,0	
Cefuroxima	NC (<i>bla</i> -) (173)	2	8	≤ 0,25 -> 8	79,8	11,6	8,7	-	0,024
	NC (<i>bla</i> +) (65)	1	2	≤ 0,25 – 4	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,5	0,5	0,5	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	4	4	4	100,0	0,0	0,0	-	
Cefaclor	NC (<i>bla</i> -) (173)	8	>16	≤ 1 -> 16	59,0	26,6	14,5	-	0,001
	NC (<i>bla</i> +) (65)	8	16	≤ 1 -> 16	84,6	10,8	4,6	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	> 16	> 16	> 16	0,0	0,0	100,0	-	
Meropenem	NC (<i>bla</i> -) (173)	0,12	0,5	≤ 0,06 – 1	97,7	-	-	2,3 ^a	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 0,06	0,12	≤ 0,06 – 0,5	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	0,12	0,5	≤ 0,06 – 1	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	0,12	0,12	0,12	100,0	-	-	0,0	
Ciprofloxacina	NC (<i>bla</i> -) (173)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06 – 0,5	100,0	-	-	0,0	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	≤ 0,06	≤ 0,06	≤ 0,06	100,0	-	-	0,0	
Cloranfenicol	NC (<i>bla</i> -) (173)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 1	≤ 1	≤ 1 – 2	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
Tetraciclina	NC (<i>bla</i> -) (173)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 1	≤ 1	≤ 1 – 4	98,5	1,5	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	100,0	0,0	0,0	-	
Trimetoprima-sulfametoxazole	NC (<i>bla</i> -) (173)	> 2	> 2	≤ 0,25 -> 2	44,5	4,6	50,9	-	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 0,25	2	≤ 0,25 -> 2	56,9	3,1	40,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 0,25	≤ 0,25	≤ 0,25	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	> 2	> 2	> 2	0,0	0,0	100,0	-	
Rifampicina	NC (<i>bla</i> -) (173)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5 -> 2	99,4	0,0	0,6	-	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	100,0	0,0	0,0	-	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	100,0	0,0	0,0	-	
Azitromicina	NC (<i>bla</i> -) (173)	1	2	≤ 0,25 - 4	100,0	-	-	0,0	Ns
	NC (<i>bla</i> +) (65)	1	1	≤ 0,25 – 2	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> -) (3)	1	2	≤ 0,25 - 4	100,0	-	-	0,0	
	Cápsula f (<i>bla</i> +) (1)	1	1	1	100,0	-	-	0,0	

S, suscetível; I, intermédio; R, resistente; a Percentagem de estirpes não suscetíveis ao Cefepime e ao Meropenem.

ANEXO VII

Anexo VII - Suscetibilidade aos antibióticos (CIM) das estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos, entre o período de 2009 a 2012.

Antibiótico	Genótipo de resistência ^a	CIM (mg/L)			Suscetibilidade (%)			P-value
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Range	S	I	R	
Ampicilina	gBLNAS (22)	0.12	1	≤0.03 – 2	95.5	4.5	0	0,000
	gBLPAR (22)	> 8	> 8	8 -> 8	0	0	100.0	
	I/II gBLNAR (133)	1	2	0.12 - 4	73.7	23.3	3.0	
	III gBLNAR (6)	1	1	1 - 4	83.3	0	16.7	
	I/II gBLPACR (26)	> 8	> 8	8 -> 8	0	0	100.0	
Co-amoxiclave	gBLNAS (22)	≤0.25	1	≤0.25 – 2	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	1	2	0.5 – 4	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	2	4	≤0.25 -> 4	98.5	0	1.5	
	III gBLNAR (6)	2	2	1 - 2	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (26)	2	2	1 - 4	100.0	0	0	
Cefotaxima	gBLNAS (22)	≤0.03	≤0.03	≤0.03 – 0.06	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.03	≤0.03	≤0.03	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	0.06	0.12	≤0.03 – 1	100.0	0	0	
	III gBLNAR (6)	0.12	0.12	0.12 – 0.5	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (26)	≤0.03	0.06	≤0.03 – 0.25	100.0	0	0	
Cefepima	gBLNAS (22)	≤0.12	0.25	≤0.12 – 0.25	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.12	≤0.12	≤0.12 – 0.25	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	0.25	0.5	≤0.12 - 2	100.0	0	0	
	III gBLNAR (6)	0.5	0.5	0.25 - 1	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (26)	≤0.12	0.25	≤0.12 - 2	100.0	0	0	
Cefuroxima	gBLNAS (22)	0.5	4	≤0.25 - 4	100.0	0	0	0,000
	gBLPAR (22)	0.5	1	0.5 - 1	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	2	8	0.5 -> 8	78.9	12.8	8.3	
	III gBLNAR (6)	> 8	> 8	4 -> 8	16.7	16.7	66.7	
	I/II gBLPACR (26)	2	4	1 - 4	100.0	0	0	
Cefaclor	gBLNAS (22)	≤1	8	≤1 - 8	100.0	0	0	0,000
	gBLPAR (22)	8	16	2 -> 16	86.4	9.1	4.5	
	I/II gBLNAR (133)	8	> 16	2 -> 16	52.6	29.3	18.0	
	III gBLNAR (6)	16	16	16 -> 16	0	83.3	16.7	
	I/II gBLPACR (26)	8	16	2 -> 16	84.6	11.5	3.8	
Meropenem	gBLNAS (22)	≤0.06	0.12	≤0.06 – 0.25	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.06	≤0.06	≤0.06 – 0.25	100.0	0	0	
	I/II gBLNAR (133)	0.12	0.5	≤0.06 – 1	97.0	0	3.0 ^b	
	III gBLNAR (6)	0.12	0.12	≤0.06 – 0.12	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (26)	0.12	0.25	≤0.06 – 0.5	100.0	0	0	
Ciprofloxacina	gBLNAS (22)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	100.0	0.0	0.0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLNAR (133)	≤0.06	≤0.06	≤0.06 – 0.5	100.0	0.0	0.0	
	III gBLNAR (6)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLPACR (26)	≤0.06	≤0.06	≤0.06	100.0	0.0	0.0	
Cloranfenicol	gBLNAS (22)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	Ns
	gBLPAR (22)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLNAR (133)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	
	III gBLNAR (6)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLPACR (26)	≤1	≤1	≤1 - ≤2	100.0	0.0	0.0	
Tetraciclina	gBLNAS (22)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	Ns
	gBLPAR (22)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLNAR (133)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	
	III gBLNAR (6)	≤1	≤1	≤1	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLPACR (26)	≤1	≤1	≤1 - ≤2	100.0	0.0	0.0	
Trimetoprima-sulfametoxazole (SXT)	gBLNAS (22)	≤0.25	>2	≤0.25 -> 2	68.2	9.1	22.7	0,000
	gBLPAR (22)	≤0.25	2	≤0.25 -> 2	81.8	9.1	9.1	
	I/II gBLNAR (133)	>2	>2	≤0.25 -> 2	36.8	4.5	58.6	
	III gBLNAR (6)	≤0.25	≤0.25	≤0.25 -> 2	83.3	0.0	16.7	
	I/II gBLPACR (26)	≤0.25	>2	≤0.25 -> 2	53.8	0.0	46.2	
Rifampicina	gBLNAS (22)	≤0.5	≤0.5	≤0.5 -> 2	95.5	4.5	0.0	Ns
	gBLPAR (22)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLNAR (133)	≤0.5	≤0.5	≤0.5 – 1	100.0	0.0	0.0	
	III gBLNAR (6)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLPACR (26)	≤0.5	≤0.5	≤0.5	100.0	0.0	0.0	
Azitromicina	gBLNAS (22)	1	2	0.5 – 2	100.0	0.0	0.0	Ns
	gBLPAR (22)	0.5	1	≤0.25 – 2	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLNAR (133)	1	2	≤0.25 – 4	100.0	0.0	0.0	
	III gBLNAR (6)	1	1	0.5 – 1	100.0	0.0	0.0	
	I/II gBLPACR (26)	1	2	≤0.25 – 2	100.0	0.0	0.0	

S, suscetível; I, intermédio; R, resistente; a Classificação baseada nas mutações identificadas no gene *ftsI*: gBLNAS, estirpes sem mutações; gBLPAR (TEM-1), produtoras de β-lactamases sem mutações; gBLPACR produtoras de β-lactamase com mutações; gBLNAR, estirpes não produtoras de β-lactamase com mutações; b Percentagem de estirpes não suscetíveis ao Meropenem.

ANEXO VIII

Anexo VIII - Suscetibilidade aos antibióticos (CIM) das estirpes estudadas, de acordo com os mecanismos de resistência aos antibióticos, entre o período de 2001 a 2008.

Antibiótico	Genótipo de resistência ^a	CIM (mg/L)			Suscetibilidade (%)			P-value
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Range	S	I	R	
Ampicilina	gBLNAS (66)	0.25	1	0.12 – 4	92.4	3.0	4.5	0,000
	gBLPAR (33)	64	256	4 -> 512	0	3.0	97.0	
	I/II gBLNAR (92)	2	2	0.12 - 8	42.4	53.2	4.3	
	III gBLNAR (2)	1	8	1 – 8	50.0	0	50.0	
	I/II gBLPACR (47)	128	512	8 -> 512	0	0	100.0	
Co-amoxiclave	gBLNAS (66)	0.5	1	≤0.25 – 4	100.0	0	0	Ns
	gBLPAR (33)	2	2	0.5 – 4	94.0	6.0	0	
	I/II gBLNAR (92)	2	2	≤0.25 -> 4	97.8	0	2.2	
	III gBLNAR (2)	2	4	2 – 4	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (47)	2	4	1 -> 4	97.9	0	2.1	
Cefotaxima	gBLNAS (66)	≤0.03	0.06	≤0.03 – 1	100.0	0	0	0,013
	gBLPAR (33)	≤0.03	≤0.03	≤0.03 – 0.06	94.0	0	6.0 ^b	
	I/II gBLNAR (92)	0.06	0.12	≤0.03 – 1	100.0	0	0	
	III gBLNAR (2)	0.06	0.12	0.06 – 0.12	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (47)	≤0.03	0.06	≤0.03 – 0.25	100.0	0	0	
Cefepima	gBLNAS (66)	≤0.12	0.25	≤0.12 -> 2	98.5	0	1.5 ^b	Ns
	gBLPAR (33)	≤0.12	≤0.12	≤0.12 – 0.5	94.0	0	6.0 ^b	
	I/II gBLNAR (92)	0.25	0.5	≤0.12 – 0.5	100.0	0	0	
	III gBLNAR (2)	≤0.12	0.25	≤0.12 – 0.25	100.0	0	0	
	I/II gBLPACR (47)	≤0.12	0.25	≤0.12 – 1	100.0	0	0	
Cefuroxima	gBLNAS (66)	0.5	4	≤0.25 -> 8	91.0	6.0	3.0	0,000
	gBLPAR (33)	0.5	4	≤0.25 -> 8	91.0	6.0	3.0	
	I/II gBLNAR (92)	4	>8	≤0.25 -> 8	67.4	18.5	14.1	
	III gBLNAR (2)	4	>8	4 -> 8	50.0	0	50.0	
	I/II gBLPACR (47)	2	4	1 -> 8	97.9	0.0	2.1	
Cefaclor	gBLNAS (66)	2	16	≤1 -> 16	87.9	6.0	6.1	0,000
	gBLPAR (33)	8	>16	≤1 -> 16	66.6	12.1	15.2	
	I/II gBLNAR (92)	16	>16	≤1 -> 16	46.7	28.3	25.0	
	III gBLNAR (2)	16	>16	16 -> 16	0	50.0	50.0	
	I/II gBLPACR (47)	8	>16	8 -> 16	57.4	29.8	12.8	
Meropenem	gBLNAS (66)	≤0.06	0.12	≤0.06 – 1	98.5	0	1.5 ^b	0,004
	gBLPAR (33)	≤0.06	0.12	≤0.06 – 0.25	94.0	0	6.0 ^b	
	I/II gBLNAR (92)	0.25	0.5	≤0.06 – 2	93.5	0	6.5 ^b	
	III gBLNAR (2)	≤0.06	1	≤0.06 – 1	50.0	0	50.0 ^b	
	I/II gBLPACR (47)	0.12	0.25	≤0.06 – 0.5	100.0	0	0	

S, suscetível; I, intermédio; R, resistente; a Classificação baseada nas mutações identificadas no gene *ftsI*: gBLNAS (n=66), estirpes sem mutações; gBLPAR (TEM-1) (n=33), produtoras de β-lactamases sem mutações; gBLPACR (n=47), produtoras de β-lactamase com mutações; gBLNAR (n=92+2), estirpes não produtoras de β-lactamase com mutações; b Percentagem de estirpes não suscetíveis à Cefotaxima, ao Cefepime e ao Meropenem.

ANEXO IX

Anexo IX - Substituições aminoacídicas identificadas na região da transpeptidase do gene *ftsI* durante o período de 2001 a 2008 (Barbosa *et al.*, 2011).

Group ^a	Nº of isolates ^b		Amino acid substitution																							
			near SSN motif										near KTG motif													
			Bla-	Bla+	Ala318	Asp350	Ser357	Ala368	Met377	Ser385	Leu389	Ala437	Ile449	Leu456	Gly490	Ala502	Val511	Arg517	Asn526	Val529	Ala530	Thr532	Val547	Asp551	Ala554	Asn569
I	1															His										
	2															His									Val	
II a	2	1		Asn									Glu				Lys		Ser							
	1			Asn													Lys				Gly					
	2							Ile									Lys		Ser							
	1																Lys		Ser			Ile				
	1																Lys									
II b	1																Lys									
		1		Asn									Glu				Lys									
	2			Asn													Lys									
	5	9		Asn									Glu				Lys				Ile	Asn			Ser	
	2			Asn													Lys				Ile				Ser	
	20	22		Asn													Lys				Ile				Ser	
	1		Thr	Asn													Lys				Ile				Ser	
	1																Lys				Ile				Ser	
	9	1										Pro	Glu				Lys				Ile				Ser	
	1												Glu				Lys				Ile				Ser	
	1			Asn	Asn												Lys				Ile				Ser	
	1	1		Asn													Lys				Ile				Ser	
	1			Asn													Lys				Ile				Ser	
	5	4		Asn													Lys		Met		Ile				Ser	
	1	2															Lys				Ile				Ser	
	6																Lys				Ile				Ser	
II c	3																Lys									
		1		Asn													Lys									Ser
	2			Asn													Lys									
	6	4		Asn													Lys									Ser
	6	1															Lys									Ser
II d	2			Asn													Lys									Ser
	1																Lys									Ser
	7																Lys									Ser
III-like	2			Asn	Asn																					
Miscell	27																									
aneous																										

a As estirpes com mutações no gene *ftsI* foram classificadas em 6 grupos: I e II (a, b, c and d) de acordo com Dabernat *et al.* (2002) e III-like de acordo com García-Cobos *et al.* (2008)

b *Bla+*, Estirpes produtoras de β -lactamase; *Bla-*: Estirpes não produtoras de β -lactamase.