

FILIPA RAQUEL PEREIRA FARIA

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM  
BACTÉRIAS PROVENIENTES DE  
NICHOS ECOLÓGICOS EXTRA-  
HOSPITALARES**



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2014



FILIPA RAQUEL PEREIRA FARIA

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM  
BACTÉRIAS PROVENIENTES DE  
NICHOS ECOLÓGICOS EXTRA-  
HOSPITALARES**



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA

FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PORTO, 2014

FILIPA RAQUEL PEREIRA FARIA

RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS  
PROVENIENTES DE NICHOS ECOLÓGICOS EXTRA-  
HOSPITALARES

Declaro que este trabalho foi realizado por mim e que todas as fontes utilizadas foram devidamente referenciadas na sua totalidade.

---

Filipa Raquel Pereira Faria

Trabalho Apresentado à Universidade Fernando  
Pessoa como parte dos requisitos para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

## RESUMO

A introdução de agentes antimicrobianos na terapêutica representou um grande progresso para a Saúde Pública, possibilitando uma evidente redução das taxas de morbidade e mortalidade associadas a doenças infecciosas. No entanto, a emergência e disseminação de resistência bacteriana face à ação dos antibióticos tem, nos últimos anos, vindo a constituir um fenómeno preocupante, representando um desafio constante à escala mundial. Diversos são os fatores que contribuem para a manifestação e disseminação de resistência, estando entre eles o uso irracional de antibióticos, a eliminação descontrolada de resíduos para o ambiente e a transmissão de genes de resistência intra e inter-espécie. O ambiente hospitalar representa o nicho ecológico mais importante, promotor do crescimento de elevados níveis de resistência, devido à pressão seletiva exercida pelo uso constante de antibióticos durante o tratamento de doenças infecciosas. Ainda que com menos frequência, mas com igual importância, a agricultura, a produção intensiva, a aquacultura, a veterinária e as zonas urbanas constituem exemplo de ambientes onde a utilização descontrolada de antibióticos parece favorecer a seleção de estirpes resistentes. Permanece, contudo, pouco esclarecida a origem de alguns dos mecanismos de resistência adquiridos, com maior relevância clínica, bem como a sua associação a bactérias de nichos ecológicos extra-hospitalares. Recentemente, tem sido dada atenção ao papel de outros ambientes não-clínicos, como áreas remotas do Globo, afastadas da elevada pressão antropogénica, como fonte e/ou reservatório de bactérias resistentes. O aparecimento de características de multiresistência a antibióticos, na ausência de exposição a estas moléculas, em isolados de animais selvagens provenientes de áreas remotas, levanta importantes questões sobre o papel deste nicho ecológico como reservatório e fonte de bactérias resistentes fora do ambiente hospitalar conduzindo à necessidade de esclarecimento da dinâmica deste preocupante fenómeno, bem como das implicações para as estratégias de controlo da resistência.

Palavras-chave: resistência, disseminação, antibióticos, doenças infecciosas, nichos ecológicos, ambientes remotos, animais selvagens.

## ABSTRACT

The introduction of antimicrobial agents in the therapy represented a major step forward for public health, enabling a clear reduction in morbidity and mortality rates associated with infectious diseases. However, the emergence and spread of bacterial resistance to antibiotics has been, in recent years, a serious concern representing a constant worldwide challenge. There are several factors that contribute to the manifestation and dissemination of resistance, among them being the irrational use of antibiotics, uncontrolled waste disposal on the environment and the transmission of resistance genes intra and inter-species. The hospital environment is the most important ecological niche, promoting growth of high levels of resistance, due to selective pressure by the constant use of antibiotics for the treatment of infectious diseases. Although less frequently, but with equal importance, agriculture, intensive farming, aquaculture, veterinary and urban areas constitute environments where uncontrolled use of antibiotics seems to favor the selection of resistant strains. Remains, however, poorly understood the origin of some of the mechanisms of acquired resistance, with clinical relevance, as well as their association with bacteria outside hospitals ecological niches. Recently, attention has been given to the role of other non-clinical settings, such as remote areas of the globe, away from high anthropogenic pressure, as source and /or reservoir of resistant bacteria. The emergence of multidrug resistance characteristics of the antibiotics in the absence of exposure to these molecules in isolated wildlife from remote areas, raises important questions about the role of this ecological niche as a reservoir and source of resistant bacteria outside the hospital leading to the need of clarification about the dynamics of this worrying phenomenon and the implications for control strategies of resistance.

Key-words: resistance, dissemination, antibiotics, infectious diseases, ecological niches, remote environments, wildlife.

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico esta secção da minha Tese de Mestrado para agradecer carinhosamente às pessoas que me ajudaram e apoiaram em todos os momentos difíceis pelos quais passei para conseguir concretizar com êxito este trabalho.

Nunca na minha vida irei esquecer a oportunidade que me foi dada pela Dra. Sandra Quinteira, que me possibilitou escrever esta Tese de Mestrado numa área que tanto admiro.

Passo a referir algumas das pessoas a quem gostaria de demonstrar o meu profundo agradecimento:

Ao meu marido, Valter Ferreira, pela compreensão e ajuda incondicional;

Aos meus pais e minha sogra, Maria Helena, pelo apoio emocional e pelas palavras certas nos momentos certos;

À minha orientadora, Dra. Sandra Quinteira, pelo tema fantástico que sugeriu, que me proporcionou abrir novas portas ao conhecimento, como também todo o apoio e orientação prestados;

Ao professor Dr. João Carlos Sousa, pela dica no sentido da orientação da minha Tese de Mestrado;

A todos os amigos, por todo o otimismo e força que me dedicaram.

A todas estas pessoas, um abraço com muito carinho e um **MUITO OBRIGADO!!!**

## ÍNDICE

Índice .....	1
Índice de figuras .....	2
Índice de tabelas .....	3
Abreviaturas e siglas .....	4
Introdução .....	5
<b>1. Principais grupos de antibióticos .....</b>	<b>8</b>
i) Inibição da síntese da parede celular .....	8
ii) Inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática .....	9
iii) Inibição da síntese proteica dos ribossomos .....	10
iv) Alteração da síntese dos ácidos nucleicos .....	11
v) Alteração de metabolismos celulares .....	11
<b>2. Resistência a antibióticos .....</b>	<b>13</b>
i) Resistência natural vs. adquirida .....	14
<b>3. Mecanismos de resistência a antibióticos .....</b>	<b>15</b>
i) Alteração da permeabilidade da membrana .....	16
ii) Expulsão ativa do antibiótico .....	17
iii) Modificação ou proteção do alvo .....	17
iv) Modificação ou inibição enzimática do antibiótico .....	18
<b>4. Bases genéticas de resistência a antibióticos .....</b>	<b>19</b>
i) Plasmídeos .....	20
ii) Transposições .....	21
iii) Integrões .....	21
<b>5. Resistência a antibióticos em bactérias provenientes de nichos extra-hospitalares .....</b>	<b>23</b>
i) Movimento de genes de resistência a antibióticos - Forças físicas .....	25
ii) Movimento de genes de resistência a antibióticos - Animais .....	27
iii) Movimento de genes de resistência a antibióticos - Humanos .....	30
iv) Resistência a antibióticos em comunidades remotas naturais .....	31
<b>6. Implicações para o Homem .....</b>	<b>33</b>
Conclusão .....	35
Referências bibliográficas .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos .....	15
<b>Figura 2</b> - Mecanismos genéticos de transferência de genes entre bactérias .....	20
<b>Figura 3</b> - Estrutura de um integrão e integração de um gene no mesmo .....	22
<b>Figura 4</b> - Fontes e movimento de genes de resistência a antibióticos no ambiente ....	26

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Antibióticos inibidores da síntese da parede celular .....	8
<b>Tabela 2</b> - Antibióticos inibidores da síntese da membrana citoplasmática .....	9
<b>Tabela 3</b> - Antibióticos inibidores da síntese proteica nos ribossomas .....	10
<b>Tabela 4</b> - Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos .....	11
<b>Tabela 5</b> - Antibióticos que alteram os metabolismos celulares .....	12
<b>Tabela 6</b> - Antibióticos e mecanismos de resistência .....	16

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

**DNA** - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

**HIV** - *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**RNA** - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

**RNA<sub>m</sub>** - *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

## INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos, nomeadamente da penicilina por Alexandre Fleming, em 1928, foi um dos acontecimentos mais marcantes da história da medicina do século XX. A sua utilização durante a Segunda Guerra Mundial levou a uma revolução, tanto na terapêutica medicamentosa como nos métodos de diagnóstico e tratamento (Pereira e Pita, 2005).

A introdução de antimicrobianos na terapêutica representou um grande progresso para a Saúde Pública possibilitando uma evidente redução da morbidade e mortalidade associadas a doenças infecciosas. Os atuais tratamentos com antibióticos passaram a representar um dos grandes progressos da medicina moderna, ajudando a combater as principais causas de morte em toda a humanidade (Tollefson e Karp, 2004). No entanto, a eficácia dos agentes antibacterianos foi rapidamente superada, uma vez que microrganismos já conhecidos têm vindo a demonstrar uma extraordinária capacidade de evolução e adaptação. As razões para esta alteração são vastas e complexas dado que entra em consideração o comportamento humano, existindo certeza de associação entre o consumo de classes específicas de antibióticos e a resistência a essas mesmas classes. Desta forma, o uso desajustado de antibióticos contribuiu para o desenvolvimento de variabilidade genética específica dos agentes etiológicos que lhes possibilitam adaptação a novas condições (Kayser, 2005).

O uso intensivo de antibióticos contribui para uma forte pressão seletiva que promove o aparecimento de estirpes resistentes aos antibióticos existentes. Desta forma, a utilização repetida e negligente de um antibiótico, designadamente para fins profiláticos ou uso em gripes com pirexia de motivo não definido, favorece o aparecimento de bactérias resistentes, da mesma ou de diferentes espécies, conduzindo à necessidade permanente de desenvolver diferentes agentes antimicrobianos que possam ser utilizados como últimos recursos no tratamento de doenças infecciosas (Tavares, 2000).

Atualmente, o conhecimento sobre os mecanismos de resistência natural e adquirida dos diversos grupos bacterianos fornecem informação relevante sobre o fenómeno de aquisição de determinantes genéticos de resistência a antibióticos. Enquanto a

resistência natural se refere a características físicas e estruturais do agente etiológico, que lhe conferem proteção contra a atividade antimicrobiana, a resistência adquirida refere-se a mecanismos que surgem como consequência de modificações no DNA (*deoxyribonucleic acid*) da bactéria, por mutação ou por transferência horizontal de genes (Murray, 1997).

A contínua evolução da resistência antimicrobiana representa uma enorme ameaça e um contínuo desafio à escala da saúde mundial. Para além de fortes repercussões a nível de Saúde Pública, também constitui um significativo encargo financeiro, o qual os serviços de saúde nacionais têm de suportar. Neste contexto, as infeções nosocomiais, frequentemente causadas por estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, constituem um sério problema, contribuindo para o aumento da taxa de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados, aumentando paralelamente o tempo de internamento destes pacientes e, conseqüentemente, o custo do tratamento (Jarvis, 1987). De facto, um dos nichos ecológicos mais importantes, promotor do crescimento de elevados níveis de resistência é, indiscutivelmente, o ambiente hospitalar (Kayser, 1993). Paralelamente a isto, a utilização abusiva de antibióticos em atividades como a agricultura, a pecuária, a aquacultura e a avicultura, tem vindo a contribuir de igual forma para o agravamento desta problemática. Frequentemente, os agentes antimicrobianos são utilizados em animais saudáveis como promotores de crescimento, proporcionando um risco efetivo do aparecimento de bactérias resistentes e sua transmissão ao Homem através da cadeia alimentar (OMS, 2012).

Apesar de ser considerado o motivo mais evidente e com maior impacto, o uso abusivo e inadequado de medicamentos anti-infecciosos na saúde humana e animal não deve ser encarado como a única causa do aparecimento da resistência em bactérias (OMS, 2012). Ainda que com menor incidência, bactérias resistentes têm sido igualmente isoladas a partir de ambientes aparentemente não sujeitos a uma pressão seletiva por agentes antimicrobianos, como plantas e água de consumo. Permanece, contudo, pouco esclarecida a origem de alguns dos mecanismos de resistência adquiridos (envolvendo essencialmente a produção de enzimas hidrolíticas), com maior relevância clínica, bem como a sua associação a bactérias de nichos ecológicos extra-hospitalares. Recentemente, tem sido dada atenção ao papel de outros ambientes não-clínicos, como

áreas remotas do Globo, afastadas da elevada pressão antropogénica, como fonte e/ou reservatório de bactérias resistentes e respetivos determinantes genéticos de resistência (Allen *et al*, 2010). Assim, o estudo da fauna selvagem que habita estas áreas remotas e muitas vezes exóticas, com a caracterização da flora microbiana associada, torna-se uma abordagem importante para a deteção e/ou identificação de novos mecanismos de resistência.

A presente tese tem como objetivo aprofundar e discutir a importância de diferentes nichos ecológicos extra-hospitalares, tais como ambientes remotos, sem a pressão seletiva humana, associados ao contributo de animais selvagens, para a dinâmica do fenómeno da resistência a antibióticos.

## 1. Principais grupos de antibióticos

Existem diversos grupos de antibióticos que estão agrupados segundo os respetivos mecanismos de ação. A divisão mais comumente utilizada baseia-se no seu mecanismo de ação, estando divididos da seguinte forma (Guimarães *et al*, 2006):

- Inibição da síntese da parede celular
- Inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática
- Inibição da síntese proteica dos ribossomas
- Alterações da síntese dos ácidos nucleicos
- Alteração de metabolismos celulares

### i) Inibição da síntese da parede celular

Para a sobrevivência de qualquer bactéria é fundamental conservar a integridade da parede celular, sendo importante mencionar que a parede celular das bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo é estruturalmente diferente. Enquanto a parede celular das bactérias de Gram-positivo consiste apenas em uma camada de peptidoglicano, a parede celular das bactérias de Gram-negativo contém uma segunda camada dupla lipídica, denominada membrana externa, do lado externo da camada de peptidoglicano. Além deste facto, a camada de peptidoglicano das bactérias de Gram-positivo é, em geral, muito mais espessa que a das bactérias de Gram-negativo. Os antibióticos com ação ao nível da síntese do peptidoglicano são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a bacitracina e os glicopéptidos (tabela 1) (Guimarães *et al*, 2006).

**Tabela 1** - Antibióticos inibidores da síntese da parede celular (adaptado de Calvo e Martínéz, 2009)

Mecanismo de ação	Grupos	Antimicrobianos representativos
Inibição da síntese da parede celular	$\beta$ -lactâmicos	Penicilinas
		Penicilina G e V
		Cloxacilina, Oxacilina, Meticilina
		Ampicilina, Amoxicilina
		Carbenicilina, Ticarcilina
		Piperacilina, Mezlocilina

**Tabela 1** - Antibióticos inibidores da síntese da parede celular (continuação) (adaptado de Calvo e Martínéz, 2009)

Mecanismo de ação	Grupos	Antimicrobianos representativos
Inibição da síntese da parede celular	β-lactâmicos	1ª Geração (Cefazolina, Cefalotina)
		2ª Geração (Cefuroxima, Cefoxitina, Cefotetan, Cefador, Cefamandol)
		3ª Geração (Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Cefixima, Cefpodoxima)
		4ª Geração (Cefepima, Cefpiroma)
	Monobactâmicos	Aztreonam
	Carbapenemos	Imipenemo, Meropenemo, Ertapenemo, Doripenemo
	Glicopéptidos	Vancomicina, Teicoplanina
	Bacitracina	Bacitracina

## ii) Inibição da síntese ou dano da membrana citoplasmática

Os antibióticos que inibem a síntese ou causam dano na membrana citoplasmática das bactérias podem ser agentes aniões, catiões ou neutros. As polimixinas (tabela 2) são moléculas anfipáticas tensioativas, pois contêm grupos lipofílicos e hidrofílicos. Estas interagem com a molécula de polissacarídeo presente na membrana externa da bactéria, retirando o cálcio e o magnésio necessários à estabilidade da mesma. A permeabilidade da membrana modifica-se imediatamente em contacto com o antibiótico e a subsequente entrada de água na célula causa a sua destruição. Desta forma, a sensibilidade de uma bactéria à polimixina B está diretamente relacionada com o seu conteúdo fosfolipídico da membrana celular (Brunton *et al*, 2008).

**Tabela 2** - Antibióticos inibidores da síntese da membrana citoplasmática (adaptado de Calvo e Martínéz, 2009)

Mecanismo de ação	Grupos	Antimicrobianos representativos
Alteração da membrana citoplasmática	Polimixinas	Polimixina B
		Polimixina E

## iii) Inibição da síntese proteica dos ribossomas

Os ribossomas bacterianos são organelos celulares constituídos por duas subunidades, 30s e 50s, onde ocorre a ligação dos fármacos por forma a inibir ou modificar a síntese proteica. Os antibióticos que atuam na subunidade 30s ribossômica, podem levar a um erro de leitura do código genético. Desta forma, a síntese proteica é inibida, quer por interferência sobre o complexo de iniciação ou levando à leitura errada do RNAm (*messenger ribonucleic acid*), que leva à incorporação de aminoácidos diferentes, resultando em uma proteína não funcional. Outro mecanismo de inibição da síntese proteica é o bloqueio do recetor na subunidade 30s que se liga ao RNAt (*transfer ribonucleic acid*) durante a tradução, levando à inibição da síntese de proteínas, impedindo a replicação e levando à morte celular. Relativamente aos antibióticos que atuam na subunidade 50s, sabe-se que podem atuar pela inibição da formação de ligações peptídicas, pelo bloqueio do alongamento do peptídeo ou pela inibição da tradução da mensagem codificada no RNAm (Katzung *et al*, 2013). São exemplo de antibióticos que inibem a síntese proteica os aminoglicosídeos, as tetraciclínas, os anfenicóis, os macrólidos, as lincosamidas e as oxazolidonas (tabela 3).

**Tabela 3** - Antibióticos inibidores da síntese proteica nos ribossomas (adaptado de Calvo e Martínéz, 2009)

Mecanismo de ação	Grupos	Antimicrobianos representativos
Inibição da síntese proteica	30s	Aminoglicosídeos Gentamicina, Tobramicina, Amicacina, Netilmicina, Estreptomicina
		Tetraciclínas Doxiciclina, Minociclina
		Anfenicóis Cloranfenicol, Tianfenicol
	50s	Macrólidos Eritromicina, Claritromicina, Espiramicina
		Lincosamidas Clindamicina, Lincomicina
		RNAt Oxazolidonas Linezolid

## iv) Alteração da síntese dos ácidos nucleicos

Os antibióticos com este mecanismo de ação inibem, direta ou indiretamente, as enzimas que atuam na síntese dos ácidos nucleicos, nomeadamente a RNA polimerase com impedimento da transcrição do DNA, a topoisomerase IV impedindo a replicação e transcrição do DNA e a DNA girase levando ao superenrolamento da molécula de DNA, conferindo-lhes desta forma o efeito bactericida (Brunton *et al*, 2008). Os antibióticos que interferem na síntese dos ácidos nucleicos são as fluoroquinolonas e a rifampicina (tabela 4).

**Tabela 4** - Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos (adaptado de Calvo e Martínéz, 2009)

Mecanismo de ação	Grupos	Antimicrobianos representativos
Inibição da síntese dos ácidos nucleicos	Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina
	Rifampicina	Rifampicina

## v) Alteração de metabolismos celulares

Os antimicrobianos com atividade antimetabólica atuam devido à sua afinidade com o PABA (*para-aminobenzoic acid*), fazendo com que este não seja utilizado pelas bactérias para a síntese de ácido fólico. Estes antibióticos são inibidores competitivos da enzima essencial à formação deste metabolito, levando à morte dos microrganismos que necessitam de sintetizar o seu próprio ácido fólico. O trimetoprim é o agente mais ativo que exerce efeito sinérgico quando utilizado com uma sulfonamida (tabela 5). Trata-se de um precursor inibidor competitivo e seletivo que aumenta exponencialmente a eficácia do tratamento (Guimarães *et al*, 2006).

**Tabela 5** - Antibióticos que alteram os metabolismos celulares (adaptado de Calvo e Martínéz, 2009)

<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Grupos</b>	<b>Antimicrobianos representativos</b>
Alteração de metabolismos celulares	Sulfonamidas	Sulfadiazina, Cotrimoxazol
		Sulfametoxazol + Trimetoprim

## 2. Resistência a antibióticos

A introdução dos agentes antimicrobianos, iniciada nos anos 40, com a descoberta da importância da penicilina, contribuiu consideravelmente para o tratamento e controle efetivo de inúmeras doenças infecciosas, até então frequentemente letais, com a consequente diminuição da gravidade e letalidade associadas. No entanto, a sua utilização contínua e intensiva no tratamento das doenças infecciosas tem vindo a representar um importante propulsor e exponenciador do fenómeno da emergência de multirresistência a antibióticos entre estirpes bacterianas de diversas espécies. Multirresistência é definida como insensibilidade ou resistência de um microrganismo aos medicamentos antimicrobianos administrados (que são estruturalmente independentes e têm alvos moleculares diferentes) apesar da anterior sensibilidade demonstrada (Tanwar *et al*, 2014). Segundo a OMS, estes microrganismos resistentes são capazes de combater o ataque de fármacos antimicrobianos, o que conduz a um tratamento ineficaz, resultando na persistência e propagação de infeções. Embora o desenvolvimento de multirresistência seja um fenómeno natural, o aumento extensivo de condições de imunocomprometimento, como as causadas pela infeção por HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), pacientes diabéticos, indivíduos transplantados e pacientes com queimaduras graves, torna o organismo um alvo fácil para aquisição de doenças infecciosas, contribuindo assim para uma maior propagação da multirresistência (OMS, 2012).

Os antimicrobianos têm sido utilizados desde há várias décadas em todo o mundo. Estudos de vigilância têm sido efetuados em diversas regiões do planeta como África, algumas partes da América, Mediterrâneo Oriental, Europa, Sudoeste Asiático e Pacífico Ocidental demonstrando que muitos microrganismos infecciosos têm evoluído ao longo dos anos, existindo um alarmante número de espécies com características de resistência aos efeitos inibitórios destes fármacos. Atualmente, quase todos os agentes infecciosos têm elevados níveis de multirresistência a antimicrobianos, acarretando consequências preocupantes para a Saúde Pública (Osterblad, 2001).

i) Resistência natural *vs.* adquirida

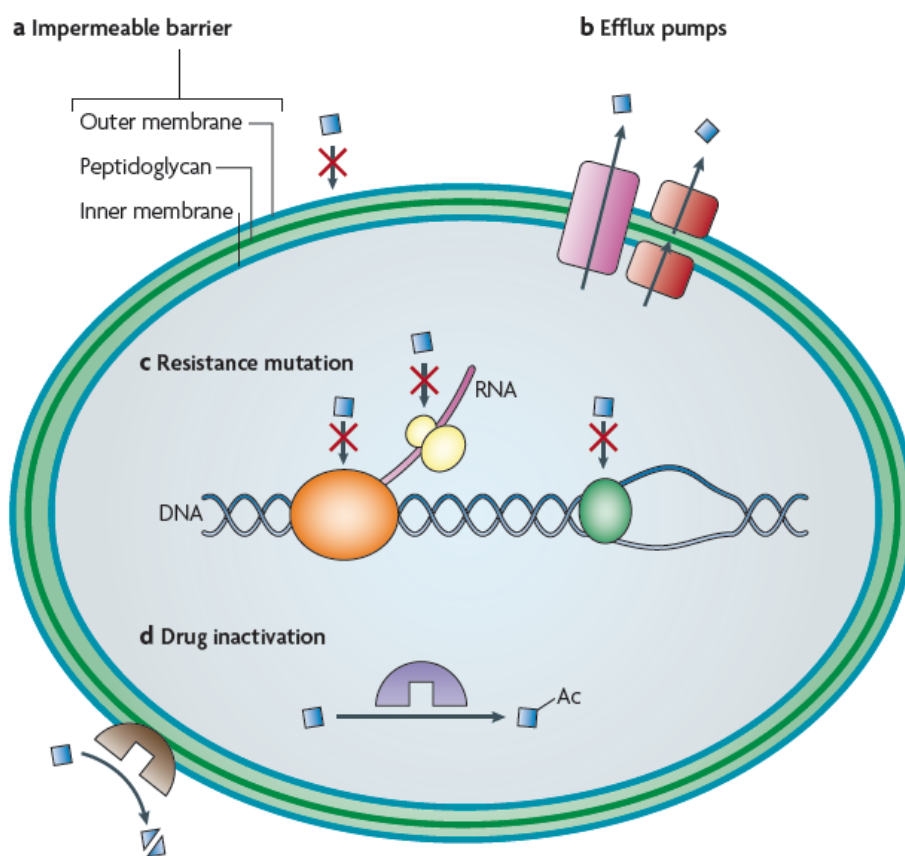
A resistência bacteriana a antibióticos é um problema de Saúde Pública a nível mundial e como tal é necessário compreender os fundamentos e processos deste acontecimento para que se possa encontrar uma solução rápida e eficaz de controlo.

A resistência natural bacteriana é uma característica constante e intrínseca de estirpes de uma mesma espécie, sendo um mecanismo permanente, determinado geneticamente e não relacionado com dose ou frequência de administração de antimicrobiano (Pérez-Cano e Robles-Contreras, 2013). Este género de resistência deve-se à ausência de um processo metabólico influenciável pelo antibiótico, à existência de enzimas que apresentam a capacidade de inativar o antibiótico ou à presença de particularidades inerentes à morfologia bacteriana, (Veiga, 1984) que levam à não eficácia da terapêutica.

Por sua vez, a resistência adquirida é uma característica própria de uma espécie bacteriana, que por natureza demonstra sensibilidade a um antibiótico, mas que tem sido geneticamente modificada, quer por mutações quer por aquisição de genes de resistência (plasmídeos, transposões e integrões). Este género de resistência é evolutiva e depende diretamente da dose ou frequência de administração de antimicrobianos (Pérez-Cano e Robles-Contreras, 2013).

### 3. Mecanismos de resistência a antibióticos

O princípio da terapêutica microbiana assenta no facto de os antibióticos serem substâncias que afetam mais adversamente os microrganismos do que os hospedeiros, atuando como agentes tóxicos seletivos. Porém, as bactérias desenvolveram variados mecanismos que conferem resistência aos antibióticos, sendo os mais comuns a alteração da permeabilidade da membrana, a expulsão ativa do antibiótico, a modificação ou proteção do alvo e a modificação ou inibição enzimática do antibiótico (figura 1) (Walsh, 2003).



**Figura 1** - Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos (extraído de Allen *et al.* 2010) **a)** Algumas bactérias são intrinsecamente resistentes a certos antibióticos (quadrados azuis) pelo facto de terem uma membrana impermeável ou faltar o alvo do antibiótico. **b)** As bombas de efluxo secretam os antibióticos a partir da célula. Alguns transportadores bombeiam os antibióticos diretamente para fora da célula (rosa) enquanto outros segregam os antibióticos para o periplasma (vermelho). **c)** Estas mutações modificam a proteína alvo, por exemplo desativando o sítio de ligação do antibiótico, deixando a funcionalidade da proteína intacta. Os exemplos específicos incluem mutações na DNA girase (verde), na RNA polimerase (laranja) e na proteína da subunidade ribossomal 30s (amarelo). **d)** A inativação pode ocorrer por modificação covalente do antibiótico, tal como a catalisada pela acetiltransferase (roxo) ou pela degradação do antibiótico, tal como a catalisada pelas  $\beta$ -lactamases (castanho).

Embora sejam muitos e variados os mecanismos de resistência aos antibióticos, na tabela 6 está representado um resumo dos antibióticos mais importantes e dos respectivos mecanismos de resistência.

**Tabela 6** – Antibióticos e mecanismos de resistência (adaptado de Gilbert *et al*, 2002)

Antibióticos	Mecanismos de resistência
( $\beta$ -lactâmicos)	
Penicilinas (Ampicilina, Amoxicilina)	- $\beta$ -lactamases
Cefalosporinas (Cefotaxima, Ceftazidima)	- mutações nas PBP
Monobactâmicos (Aztreonam)	- diminuição da permeabilidade da membrana
Carbapenemos (Imipenemo)	- expulsão ativa do antibiótico
Glicopéptidos (Vancomicina, Teicoplanina)	- alteração do alvo do antibiótico
Tetraciclina	- expulsão ativa do antibiótico - proteção do alvo - inibição enzimática
Cloranfenicol	- inibição enzimática
Aminoglicosídeos (Estreptomicina, Gentamicina, Canamicina)	- modificação enzimática
Macrólidos (Eritromicina) e Lincosamidas	- modificação do alvo - expulsão ativa do antibiótico - inibição enzimática
Sulfametoxazol e Trimetoprim	- modificação do alvo
Quinolonas	- modificação do alvo
Rifampicina	- modificação do alvo
Quinupristina – dalfopristina	- modificação enzimática

i) Alteração da permeabilidade da membrana

A alteração da permeabilidade da membrana celular é devida a mudanças que ocorrem nos receptores bacterianos específicos para os antimicrobianos ou a mudanças estruturais nos componentes do envelope da célula bacteriana (membrana ou parede celular) que têm influencia direta na permeabilidade. Também pode ocorrer perda de capacidade de transporte ativo através da membrana celular ou expressão de bombas de efluxo como

consequência da entrada de antibiótico na célula bacteriana (Pérez-Cano e Robles-Contreras, 2013).

A redução da permeabilidade, que ocorre por perda ou alteração de canais de porina, é um mecanismo de resistência importante nas bactérias de Gram-negativo, uma vez que estas possuem uma membrana externa com elevado teor de lípidos que lhes fornece uma barreira eficaz contra a entrada de antibióticos. Desta forma, é importante a existência de canais de porina que permitam a internalização de compostos hidrofílicos, que ao estarem comprometidos podem levar à multirresistência e resultam, normalmente, de mutações espontâneas selecionadas pela pressão exercida pelo uso de antibióticos (Sefton, 2002).

ii) Expulsão ativa do antibiótico

O mecanismo de expulsão ativa do antibiótico depende de energia e é utilizado pelas bactérias para reduzir as concentrações de antibiótico na célula. Estas bombas de efluxo têm como objetivo expulsar substâncias tóxicas, podendo expulsar os antibióticos e conferir à bactéria resistência. Algumas bombas são específicas para determinados antibióticos enquanto outras bombas conseguem expulsar diferentes tipos de antibióticos. No entanto, as primeiras conferem um nível de resistência mais elevado que as segundas aos respetivos antibióticos (Sefton, 2002).

iii) Modificação ou proteção do alvo

A resistência bacteriana conferida pela alteração do sítio onde atua o antibiótico consiste na modificação de alguns sítios específicos da célula bacteriana como a parede celular, a membrana celular, as subunidades 30s e 50s ribossomais, entre outros (Pérez-Cano e Robles-Contreras, 2013). Este mecanismo de modificação ou proteção do alvo do antibiótico pode resultar de dois processos. O primeiro origina uma alteração devido a uma mutação do local específico onde o antibiótico se liga, provocando uma diminuição de afinidade. O segundo origina a produção de uma proteína que se liga ao local específico onde o antibiótico atua (Spinosa *et al*, 2006).

A modificação do alvo é o mecanismo mais importante na resistência cruzada entre antibióticos levando à seleção de microrganismos multirresistentes. A resistência cruzada é um fenômeno bem conhecido e ocorre quando os antibióticos apresentam o mesmo local alvo, podendo ou não pertencer à mesma classe (Levy, 2002).

iv) Modificação ou inibição enzimática do antibiótico

A modificação ou inibição enzimática de antibióticos é um dos mecanismos mais importantes e mais frequentes entre as bactérias de Gram-negativo o qual afeta, por exemplo, os antibióticos que possuem anel  $\beta$ -lactâmico. Neste mecanismo específico de resistência a antibióticos há destruição ou modificação da estrutura química por um processo molecular caracterizado pela produção de enzimas denominadas  $\beta$ -lactamases, que atuam por destruição da estrutura química do antibiótico (Tortora *et al*, 2012).

As famílias de  $\beta$ -lactamases que apresentam maior relevância são as  $\beta$ -lactamases TEM (as mais frequentemente encontradas em bactérias de Gram-negativo), as  $\beta$ -lactamases SHV (sulfidril variável), as  $\beta$ -lactamases CTX (cefotaximases), as  $\beta$ -lactamases AmpC, as  $\beta$ -lactamases OXA (oxacilinas) e as carbapenemases (constituídas por uma combinação heterogênea de penicilinas, metaloenzimas e oxacilinas) (Livermore, 1995). As  $\beta$ -lactamases TEM podem ainda ser divididas em penicilinas, ESBL (*extended-spectrum beta-lactamases*) e IRT (*inhibitor resistant TEM*). Recentemente, também as enzimas SHV e CTX-M passaram a constituir o grupo de ESBLs (Chaïbi *et al*, 1996).

Devido ao elevado número de bactérias resistentes como consequência da produção de  $\beta$ -lactamases, foram desenvolvidos  $\beta$ -lactâmicos contendo compostos associados (ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam) capazes de inativar estas enzimas.

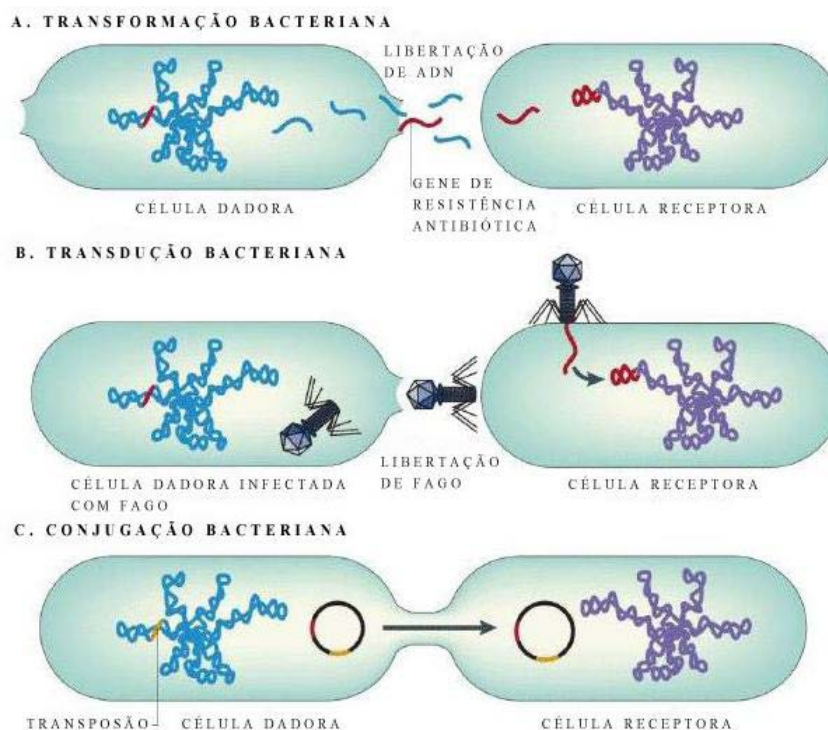
#### 4. Bases genéticas de resistência a antibióticos

O fenômeno de emergência e disseminação de resistência a antibióticos, intimamente associado a mutações e a transferência horizontal de genes, representa atualmente um sério problema no contexto do controle e tratamento efetivo das doenças infecciosas de origem bacteriana. As bactérias apresentam diversos mecanismos facilitadores da troca de genes de resistência, não sendo exclusivos de populações bacterianas da mesma espécie, o que explica parcialmente o aumento da resistência aos antimicrobianos (Sánchez et al, 2012). A transferência horizontal de genes consiste num processo de aquisição de material genético que pode conter vários genes de resistência a diferentes classes de antibióticos conferindo, às bactérias que os possuem, um fenótipo de multiresistência. A localização dos determinantes genéticos codificadores de mecanismos de resistência a antibióticos em elementos genéticos móveis, ou mobilizáveis, possibilita e promove a sua transferência e propagação (Spinosa *et al*, 2006).

As mutações são mecanismos, espontâneos ou induzidos, que podem dar origem a resistência bacteriana, contribuindo desta forma para o aumento da variabilidade genética. As mutações espontâneas resultam da alteração, inserção ou remoção de bases originando rearranjos cromossômicos e as mutações induzidas ocorrem por ação de agentes químicos, agentes físicos (radiações), agentes alquilantes ou presença de espécies reativas de oxigênio. No entanto, este mecanismo de resistência parece ser mais raro, quando comparado com a transferência horizontal de genes (Martinez e Baquero, 2000).

Os principais mecanismos de transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos são a conjugação (plasmídeos, integrões e transposões), a transdução (bacteriófagos) e a transformação (incorporação de DNA livre exógeno) (figura 2). A transformação consiste na captação e introdução dentro da célula de segmentos de DNA provenientes de outras células presentes no meio circundante (Sousa *et al*, 1998). A transdução é um processo pelo qual o DNA é incorporado num bacteriófago e transferido para outra bactéria da mesma espécie (Hawkey, 1998). A conjugação

envolve o contato célula-célula, durante o qual o DNA extracromossômico é transferido de uma bactéria para outra (Mascaretti, 2003).



**Figura 2** - Mecanismos genéticos de transferência de genes entre bactérias (extraído de Furuya e Lowy, 2006)

i) Plasmídeos

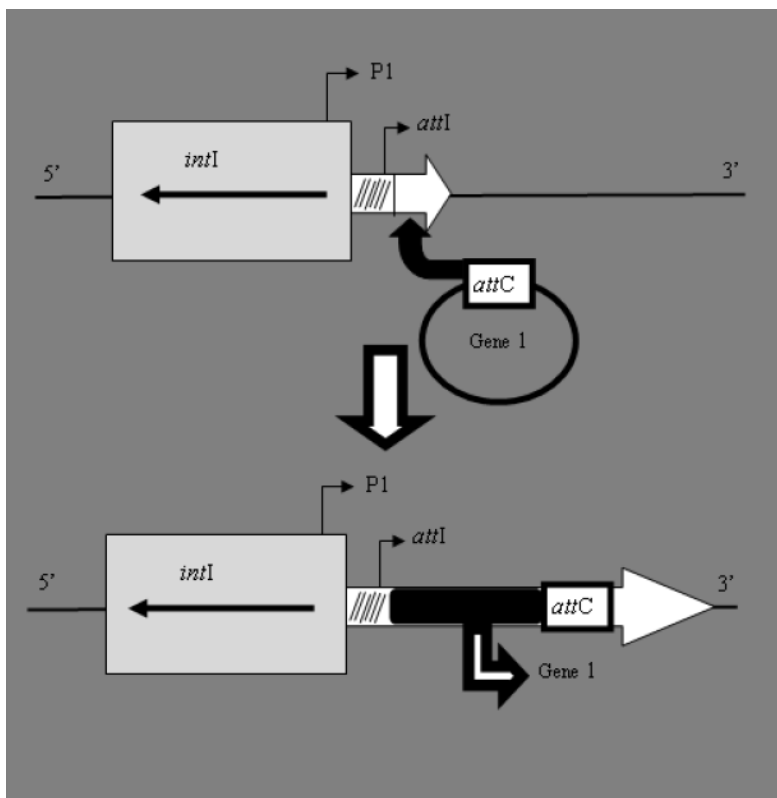
Os plasmídeos possuem cadeia dupla de DNA superenrolada e têm replicação independente do cromossoma bacteriano. São importantes veículos de transporte e mobilidade de genes que, em alguns casos, permitem à bactéria uma melhor adaptação ao ambiente que colonizam ou em que se encontram. A incorporação de plasmídeos, contendo genes de resistência a antibióticos, pode conduzir à expressão destes genes em outra célula, tornando-a também resistente. A capacidade conjugativa de uma bactéria é normalmente codificada em plasmídeos, designados de plasmídeos F, de fertilidade ou conjugativos. Estes plasmídeos conferem à bactéria a capacidade de estabelecer contacto com outras bactérias, por meio de um tubo de conjugação para a transferência de genes plasmídicos (Case *et al*, 2000).

ii) Transposições

Os transposões e sequências de inserção são elementos genéticos que permitem a mobilidade dentro do genoma dos microrganismos, uma vez que em certas condições são capazes de mudar de lugar (Sánchez *et al*, 2012). Estes elementos genéticos móveis possuem duas sequências de inserção que flanqueiam um ou mais genes que vão ser transportados. Os transposões inserem-se aleatoriamente no genoma sendo a transposição o mecanismo que descreve a transferência de segmentos cromossomais, de uma posição para outra. Os dois mecanismos de transposição conhecidos são a replicativa, na qual se forma uma cópia do elemento transponível (uma das cópias permanece no sítio original e outra cópia move-se e insere-se num novo local) e a conservativa, em que o elemento original se excisa, movendo-se para outro local. Os transposões podem conter genes de resistência a antibióticos e transferir-se para uma nova posição no cromossoma ou para um plasmídeo (Vizváryová e Valková, 2004).

iii) Integrões

Os integrões, descritos em 1989 por Hall e colaboradores, são uma família de elementos genéticos potencialmente mobilizáveis, capazes de integrar e expressar genes de resistência a antibióticos (figura 3). Como parte da estrutura base do integrão, existe um gene que codifica uma proteína com atividade de recombinação denominada integrase e, adjacente a ela, existe o sítio de recombinação específica onde se integra o gene ou genes de resistência, obtendo-se assim o que se denomina por cassete de genes de resistência. Os integrões não podem realizar autotransposição, mas associam-se frequentemente a sequências de inserção, transposões e plasmídeos conjugativos que lhes servem como veículo para a sua propagação intra e inter-espécie (Sánchez *et al*, 2012).



**Figura 3** - Estrutura de um integrão e integração de um gene no mesmo (extraído de Spinoso *et al*, 2010)

As cassetes de genes normalmente codificam resistência aos antibióticos e, quando integradas, os genes podem ser expressos devido a um promotor presente na estrutura conservada do integrão. Assim, os integrões representam um importante elemento responsável pela disseminação de multirresistência em bactérias, uma vez que normalmente se encontram associados a outros elementos genéticos de transferência (Hall e Collins, 1995).

## **5. Resistência a antibióticos em bactérias provenientes de nichos ecológicos extra-hospitalares**

As bactérias que apresentam resistência a antibióticos representam um sério problema para a saúde humana, pela inerente falha no tratamento e dificuldade de combate efetivo contra as doenças infecciosas que produzem. Várias evidências parecem apontar para o facto de que a antibiorresistência terá evoluído em ambientes não-clínicos (naturais) previamente ao início da utilização de antibióticos pelo ser humano. Tendo em conta que a biosfera é constituída sobretudo por microrganismos, compreender o seu papel funcional e dos seus elementos de resistência na natureza é de fundamental importância tanto para a saúde humana como do ponto de vista ecológico (Thaller *et al*, 2010).

Estudos recentes demonstram que alguns antibióticos, em baixas concentrações como as encontradas nos ecossistemas naturais, favorecem fins metabólicos ou de sinalização, conduzindo ao desenvolvimento de alguns genes de resistência como forma de seleção dos seus hospedeiros. No entanto, as elevadas concentrações de antibióticos lançados em habitats específicos (por exemplo, ambiente hospitalar, aquacultura, agricultura, pecuária, avicultura), como consequência da atividade humana têm modificado bastante esses papéis funcionais. A poluição dos ecossistemas naturais por antibióticos e consequente alteração dos genes de resistência tem evidenciado consequências relevantes para a evolução da microbiosfera. Considerando que a maioria das bactérias patogénicas causa infeções geralmente transitórias e de fácil tratamento, quando, após pressão seletiva, adquirem características de resistência como por exemplo a aquisição de genes de resistência a antibióticos presentes em unidades de transferência genética, podem alcançar um potencial de difusão na natureza eminente, determinando um grave problema na microbiota ambiental e, previsivelmente, na saúde humana (Martinez, 2009).

Tendo em consideração que diversos antibióticos são produzidos por microrganismos ambientais, é admissível que possam constituir uma fonte de genes de resistência a antibióticos adquiridos por transferência horizontal, uma vez que estes microrganismos possuem sistemas para evitar a atividade dos agentes antimicrobianos sobre si mesmos. Independentemente do seu papel funcional em ambientes não-clínicos, os genes de

resistência a antibióticos com origem em bactérias ambientais com baixa suscetibilidade a antibióticos, podem causar mudanças nos ecossistemas naturais que se traduzem em grande impacto sobre a resistência a antibióticos. A baixa suscetibilidade a antibióticos é comum a todos os membros de uma determinada espécie bacteriana. Por exemplo, as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* produzem naturalmente a mesma informação genética que codifica bombas de efluxo e  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC que contribuem para o fenótipo de resistência intrínseca apresentada por esta espécie. Esta informação é consistente com a concepção de que o fenótipo de resistência intrínseca a antibióticos é consequência de uma evolução inata em ambientes naturais e não do recente uso excessivo de antibióticos na terapêutica humana ou em outras atividades como a agricultura ou produção animal intensiva (Alonso *et al*, 1999).

Os genes de resistência a antibióticos, presentemente existentes em bactérias patogênicas, estão envolvidos na destoxificação de antibióticos pelos microrganismos produtores ou na resistência a compostos tóxicos produzidos por plantas, sendo considerados "escudos" de proteção. No entanto, evitar a atividade antibiótica não é permanentemente o papel fundamental de alguns determinantes de resistência a antibióticos. Por exemplo, as  $\beta$ -lactamases codificadas por plasmídeos, que são consideradas determinantes de resistência a antibióticos muito proficientes, adquiridas por bactérias patogênicas por transferência horizontal, podem ter sido originalmente PBPs (*penicillin binding proteins*) envolvidas na síntese de peptidoglicano e a sua atividade contra os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ser um resultado secundário da sua função original (Kelly *et al*, 1986; Massova e Mobashery, 1998; Meroueh *et al*, 2003). Este exemplo realça a noção de que, um determinante que contribui para a resistência a antibióticos por parte de agentes patogênicos humanos, pode estar envolvido nos processos metabólicos naturais das bactérias ambientais no seu habitat natural. Assim, uma enzima que apresente um substrato com semelhanças estruturais a determinado antibiótico, pode inibir esse antibiótico, através de um mecanismo de resistência natural específico, característico de nichos ecológicos com elevada utilização de antibióticos como é o caso do ambiente hospitalar (Martinez, 2009).

Recentemente têm sido desenvolvidos estudos em nichos ecológicos extra-hospitalares nos quais foram obtidos dados sobre a presença de resistência adquirida em microbiota

comensal de vários animais selvagens, principalmente mamíferos e aves em diversos ambientes remotos (Thaller *et al*, 2010). O estudo de bactérias provenientes de animais selvagens tem assumido um papel relevante, na caracterização de mecanismos de resistência a antibióticos, em ambientes aparentemente fora da ação do Homem e da influência de agentes antimicrobianos. No entanto, o termo "selvagem" tem desencadeado alguma discussão entre os diferentes autores, uma vez que inclui todos os animais não-domesticados, que vivem nas mais diferentes condições ecológicas, com alimentação e comportamentos sociais distintos (Kozac *et al*, 2001).

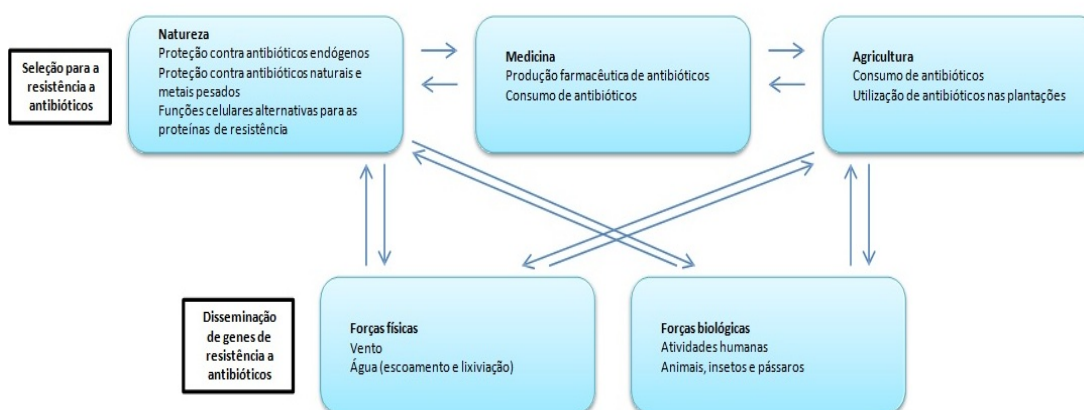
A análise e compreensão do contributo de animais selvagens, bem como dos seus habitats naturais, no contexto da disseminação de bactérias resistentes a antibióticos, torna-se, assim, premente e indispensável.

i) Movimento de genes de resistência a antibióticos - Forças físicas

As forças físicas, tais como as criadas pelo vento e pela água, são fatores de particular relevo para a difusão de genes de resistência a antibióticos (Allen *et al*, 2010). A entrada dos antibióticos no ambiente pode dar-se por várias vias, como por exemplo em cursos de água localizados nas proximidades de aviários, resultando na contaminação das águas de superfície e residuais (Hirsch *et al*, 1999). A contaminação microbiana dos recursos hídricos com resíduos fecais humanos e de outros animais, representa um grande risco para a Saúde Pública (Pathak e Gopal, 2007). Os antibióticos utilizados em aquacultura, como por exemplo as tetraciclinas, as sulfonamidas e o cloranfenicol, contaminam o meio recetor, uma vez que estes, bem como outros quimioterápicos, são aplicados em conjunto com aditivos alimentares. Verifica-se, desta forma, a acumulação de antibióticos nos sedimentos, devido ao excesso de alimento aplicado e à produção de excrementos por parte dos peixes, podendo ocorrer degradação ou lixiviação (figura 4) para as águas subterrâneas circundantes. Se os antibióticos não forem degradados ou metabolizados, durante o tratamento nas ETARs (Estação de Tratamento de Águas Residuais), podem contaminar o solo e, assim, atingir os lençóis freáticos, as águas superficiais e, em última instância, a água para consumo humano (Hirsch *et al*, 1999). A utilização indiscriminada de antibióticos poderá contribuir, assim, para o fenómeno de seleção de novas bactérias resistentes, não esquecendo que também o fenómeno de

aquisição de genes de resistência associados a bactérias, que são transferíveis na natureza para áreas remotas do Globo, pode resultar na sua disseminação entre espécies bacterianas aquáticas sensíveis (Chen *et al*, 2005).

Segundo um estudo sobre contaminação bacteriana e resistência a antibióticos em bactérias provenientes do escoamento de águas glaciares, foi possível identificar a presença de bactérias indicadoras de poluição fecal, coliformes e *Streptococcus* fecais em amostras de água provenientes do glaciar Gangotri. Apesar da resistência aos antibióticos entre populações bacterianas características de regiões com baixa atividade antropogénica ser incomum, a maioria dos isolados de *E. coli* encontrados nestas amostras, apresentava resistência a múltiplos antibióticos. Considerando que todos os anos milhares de peregrinos, turistas e exploradores visitam a região do glaciar Gangotri, é possível que os resultados obtidos neste estudo estejam diretamente relacionados com a contaminação aquática por resíduos fecais de moradores locais, campistas, peregrinos hindus (que se banham nas águas geladas, como ritual sagrado), turistas, gado e animais selvagens (Pathak e Gopal, 2007).



**Figura 4** - Fontes e movimento de genes de resistência a antibióticos no ambiente (adaptado de Allen *et al*, 2010)

ii) Movimento de genes de resistência a antibióticos - Animais

Os animais selvagens proporcionam um complexo mecanismo biológico para a disseminação de genes de resistência a antibióticos. A proximidade com as atividades humanas influencia os perfis de resistência a antibióticos das bactérias do intestino de mamíferos selvagens, nas quais os antibióticos selecionaram resistência. Um estudo efetuado em isolados bacterianos de ratos capturados numa zona rural de Inglaterra indica que 90% das bactérias eram resistentes a  $\beta$ -lactâmicos. Por outro lado, a resistência a antibióticos em bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas de alces selvagens, veados e ratazanas da Finlândia era praticamente inexistente. Tendo em consideração que a Finlândia possui uma menor densidade populacional quando comparada com a Inglaterra, estes resultados podem sugerir que as atividades humanas influenciam a resistência a antibióticos nas bactérias presentes em animais selvagens (Allen *et al*, 2010).

Segundo um estudo efetuado por Schierack *et al* (2009), onde foi feito o isolamento e caracterização de clones de *Escherichia coli* obtidos de diversas porções do intestino de javalis selvagens, foi possível verificar que as populações de *E. coli* encontradas nestes animais são muito similares às anteriormente descritas em porcos de produção intensiva. Tendo em consideração que a ocorrência de resistência a antibióticos em estirpes de *E. coli* de suiniculturas está possivelmente relacionada com a utilização de antibióticos como fatores de crescimento, e constatando que também as estirpes comensais de *E. coli* desenvolveram mecanismos de resistência (não sofrendo a pressão antropogénica), pode considerar-se que as estirpes comensais já possuíam genes de resistência como forma de seleção natural.

A presença de bactérias com características de multirresistência, muito similares às geralmente encontradas em ambiente hospitalar, foi recentemente descrita em amostras de fezes de várias espécies de animais icónicos (como o camelo bactriano, o cavalo Prezwalski e o burro selvagem da Mongólia) que habitam um dos últimos entrepostos selvagens do mundo, a região da Rota da Seda e a região do Planalto Tibetano (Mendes, 2012). Esta descrição, contrariamente ao inicialmente esperado, revelou-se surpreendente, uma vez que as amostras deste estudo provinham de animais endémicos

de uma das regiões mais remotas do planeta, onde a influência humana na ecologia da resistência antimicrobiana será extremamente escassa e o efeito da pressão seletiva exercido pela utilização dos antibióticos será virtualmente nulo, pelo que a ausência de bactérias com resistência a agentes antimicrobianos seria teórica e naturalmente o resultado mais esperado. Foi, por exemplo, possível obter isolados bacterianos com fenótipos de resistência ao imipenemo, como é o caso de *Brevundimonas vesicularis* e de *Proteus mirabilis*. Sendo este antibiótico de uso exclusivo hospitalar, a sua presença em animais que habitam áreas remotas pouco povoadas é um indicador com importante relevância. Também em isolados de *Enterococcus* spp. foi possível observar uma elevada taxa de resistência à tetraciclina (76%, maioritariamente associadas à produção de genes *tetM* e *tetL*), à eritromicina (57%, associada à produção do gene *ermB*) e, apesar de numa taxa de incidência mais baixa, mas com grande impacto, à vancomicina (10%). A deteção do gene *bla<sub>CTX-M</sub>* em todas as bactérias com diminuição de suscetibilidade à cefotaxima reveste-se de particular interesse, tendo em conta que a maioria dessas bactérias pertencem às mesmas espécies habitualmente implicadas em infeções nosocomiais nos hospitais (Mendes, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado que, também as aves selvagens migratórias desempenham um papel importante na circulação e difusão de microrganismos patogénicos, uma vez que estas transportam um reservatório de bactérias resistentes a antibióticos com potencial de disseminação a longa distância. Devido à sua natureza, as aves aquáticas migratórias viajam grandes distâncias e habitam uma grande variedade de ambientes, desde lagoas agrícolas até lagos em montanhas remotas, e podem, potencialmente, disseminar bactérias contendo genes de resistência ao longo do caminho. A proximidade com a atividade humana aumenta o número de bactérias resistentes aos antibióticos que são transportadas pelas aves selvagens, quer sejam adquiridas diretamente ou por contato com outras aves que contactam com esses ambientes, ilustrando as grandes distâncias percorridas por genes de resistência que estão associados a pressões seletivas antropogénicas (Cole *et al*, 2005). Um estudo recente, sobre a presença de *Enterococcus* resistentes à vancomicina no Alaska, mostrou que as bactérias resistentes aos antimicrobianos e os seus genes de resistência já se espalharam para uma das áreas mais remotas da América do Norte através de gaivotas hiperbóreas, o que sugere que poucos locais no planeta estarão protegidos contra a

propagação de tal resistência, uma vez que os mecanismos de dispersão são muito eficientes (Drobni *et al*, 2009).

A intensidade de propagação de determinantes de resistência a antibióticos, por este meio, está também demonstrada num estudo sobre a disseminação de bactérias com multirresistência no Ártico, região sujeita a mínima exposição humana. Apesar desta ínfima exposição, foi possível identificar resistência a antibióticos em isolados de *E. coli* de amostras de gansos migratórios do Canadá e Gaivotas-de-cabeça-preta da República Checa, nomeadamente à ampicilina, à cefalotina e ao sulfatiazol. Diversas explicações podem ser consideradas para a existência de resistência a antibióticos na microbiota comensal das aves do Ártico: (i) a resistência pode desenvolver-se através de mutações espontâneas, (ii) a resistência pode ser adquirida por transferência horizontal de genes de outros microrganismos (uma vez que muitas bactérias e fungos constituem fontes naturais de genes de resistência a antimicrobianos e podem servir como reservatórios ambientais) e (iii) as bactérias com resistência a antibióticos podem ser transportadas para a região, quer por aves migratórias ou por meio de dejetos humanos ou animais (Sjölund *et al*, 2008).

O estudo da epidemiologia da resistência a antibióticos em bactérias provenientes de animais marinhos representa igualmente, neste contexto, um importante contributo, uma vez que o seu habitat e as suas características alimentares poderão contribuir para a transmissão de genes de resistência (Brownstein *et al*, 2011). Existem evidências da ocorrência e diversidade do gene de resistência à tetraciclina *tet(M)* em bactérias entéricas de pinguins da Antártida mas, uma vez que não existem registos de investigação deste gene de resistência nesta zona do globo, mantém-se a dúvida se surgiram como um mecanismo de seleção natural ou se foram transportados por forças físicas ou por outros animais. Apesar desta incerteza, é possível que os pinguins da Antártida atuem, tanto como reservatório para bactérias que possuem este gene de resistência, como potenciais disseminadores do mesmo para as suas crias através da alimentação por regurgitação e para todo o ecossistema via contaminação fecal (Rahman *et al*, 2008).

iii) Movimento de genes de resistência a antibióticos - Humanos

A presença de bactérias com resistência a antibióticos foi já descrita em estudos efetuados em comunidades humanas isoladas, embora pareça existir uma relação direta entre a proximidade com a civilização e o tipo de resistência microbiana encontrada. Por exemplo, embora as estirpes de *Salmonella* e *Shigella* possuam características naturais de resistência a antibióticos, foi possível observar que existiam muito menos estirpes resistentes entre os isolados obtidos de indivíduos residentes no Nepal, comparativamente com outros residentes mais perto de zonas densamente povoadas. Com o aumento da densidade populacional e das viagens pelo planeta, o contato pessoa a pessoa com comunidades relativamente isoladas aumentou. Desta forma, torna-se cada vez mais difícil determinar as verdadeiras causas de sensibilidade vs. resistência em bactérias provenientes de populações com contato mínimo com antibióticos. No entanto, a distribuição de resistência aos diferentes antibióticos nesta comunidade coincidiu com o esperado, uma vez que os níveis de resistência eram maiores relativamente a antibióticos mais antigos e mais utilizados ( $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas) e mais baixos relativamente a antibióticos recentes com utilização mais restrita (gentamicina e fluoroquinolonas) (Walson *et al*, 2001).

Elevados níveis de resistência a antibióticos foram igualmente encontrados em estirpes de *E. coli* isoladas de uma população humana residente numa comunidade remota da Bolívia, tendo-se demonstrado que essas bactérias apresentavam fenótipos de resistência semelhantes aos encontrados em zonas com densa população (Bartoloni *et al*, 2004). Uma vez que esta população tem pouco acesso a cuidados de saúde modernos e o contato com pessoas de fora da comunidade é mínimo, é possível que a resistência a antibióticos detetada esteja relacionada com a migração de um conjunto de genes de resistência a partir de outros lugares. De facto, resultados obtidos demonstram que apesar das barreiras físicas existentes, os genes de resistência a antibióticos são transmitidos para populações humanas mais isoladas, mesmo na óbvia ausência de uma pressão de seleção (Allen *et al*, 2010). Dois modelos poderão ser equacionados e utilizados para compreender a imprevista constatação de uma elevada prevalência de bactérias resistentes a antibióticos em comunidades remotas onde a exposição a antibióticos é mínima e não havendo fontes óbvias de contaminação prolongada a partir

do exterior: (i) seleção primitiva de resistência na comunidade remota devido a condições ambientais particulares (por exemplo, uma exposição constante a produtos naturais com atividade antibiótica em alimentos ou água) e (ii) a introdução de estirpes de resistência (através de forças físicas ou contaminação animal) seguido pela disseminação local e manutenção da resistência pela ausência de exposição a antibióticos (Pallecchi *et al*, 2007).

Independentemente de qual o mecanismo responsável por esta diversidade genética, as razões para a manutenção da elevada prevalência de resistência na ausência do uso de antibióticos permanecem inexplicadas. A exposição substancial aos antibióticos naturais parece improvável, uma vez que isso implicaria a presença de bactérias que obedecessem aos mesmos padrões de resistência encontrados em isolados obtidos em áreas expostas ao uso de antibióticos (Bartoloni *et al*, 2006).

#### iv) Resistência a antibióticos em comunidades remotas naturais

O conhecimento sobre o efeito da pressão de seleção nos genes de resistência a antibióticos, antes da fase em que estes foram transformados em produtos farmacêuticos ou em ambientes remotos com pouco contato humano direto, é francamente escasso. A descoberta do enorme potencial terapêutico dos compostos microbianos, conduziu à preconceção de que a atividade antibiótica está amplamente difundida na natureza. Com base nos estudos genômicos existentes, pensa-se que as populações microbianas são capazes de produzir uma grande variedade de pequenas moléculas bioativas, mas só uma pequena percentagem destas moléculas foram isoladas, identificadas e utilizadas como antibióticos e em outros tipos de terapêutica (Allen *et al*, 2010). Sabe-se, por exemplo, que todas as bactérias do filo Actinobacteria, um grande grupo taxonómico que compreende diversos géneros, produzem pequenas moléculas bioativas complexas (Ventura *et al*, 2007).

Tendo em consideração o potencial reconhecido aos compostos microbianos, é de conjecturar que os genes de resistência a antibióticos são comuns em ambientes naturais, fora da pressão antropogénica direta, e já existiam, codificados em plasmídeos, antes do uso de antibióticos na terapêutica. Análises filogenéticas estimam a data de origem de

$\beta$ -lactamases de centro serina em mais de dois bilhões de anos e sugerem que muitas destas enzimas estiveram codificadas em plasmídeos durante milhões de anos (Hall e Barlow, 2004). No entanto, alguns estudos têm produzido resultados conflituosos que estimulam discussões sobre a existência (ou não) de genes de resistência como forma de seleção natural e a conveniência de uma política de controlo restrita ao uso de antibióticos para o controlo da resistência. A discussão surgiu principalmente após os estudos de Gilliver *et al* (1999), onde se observou uma notável prevalência de características adquiridas de resistência a antibióticos em fezes de roedores selvagens que viviam na floresta do noroeste de Inglaterra, onde não existe influência de antibióticos. Em contrapartida, o estudo realizado por Österblad *et al* (2001), obteve resultados contraditórios uma vez que detetou ausência manifestamente total de resistência em isolados de *Enterobacteriaceae* provenientes de fezes de roedores selvagens e ungulados (cavalos, porcos e cabras) que vivem em áreas remotas da Finlândia. Igualmente na Bolívia (Pallechi *et al*, 2007) e na Amazónia (Bartoloni *et al*, 2009) foram efetuados estudos para tentar compreender a dinâmica deste fenómeno. Apesar de serem locais com características geográficas e climatéricas diferente, apresentam níveis de isolamento e exposição a antibióticos comparáveis, pelo que a descrição de resistência aos antibióticos, observada nestas comunidades remotas com níveis reduzidos ou inexistentes de exposição, são o resultado de um complexo mecanismo de resistência bacteriana. A análise molecular dos isolados obtidos nestas áreas demonstrou que os genes de resistência adquiridos não são diferentes dos obtidos em áreas expostas a antibióticos, evidenciando também uma notável diversidade de estirpes resistentes bem como diversos tipos de genes de resistência e respetivos determinantes genéticos (Pallechi *et al*, 2007; Bartoloni *et al*, 2009).

Tendo em consideração que todas as amostras examinadas nos estudos referidos anteriormente provinham de animais endémicos de zonas distantes do Globo, onde a interferência humana na ecologia da resistência antimicrobiana é escassa e o resultado da pressão seletiva exercida pela utilização de antibióticos é praticamente nulo, a inexistência de bactérias com resistência a agentes antimicrobianos seria presumivelmente o resultado mais provável. No entanto, os resultados apresentados indicam a existência de bactérias, com características de multirresistência, muito semelhantes às comumente encontradas em ambiente hospitalar.

## 6. Implicações para o Homem

Mundialmente existem cada vez mais bactérias resistentes (particularmente em meio hospitalar), aumentando a morbidade, os custos inerentes à prestação de cuidados de saúde, bem como as taxas de mortalidade por doenças infecciosas. As taxas de resistência bacteriana mais elevadas parecem surgir nos países que consomem mais antibióticos, reforçando a teoria de que o consumo estimula a resistência (Dias *et al*, 2010). Concomitantemente com os antibióticos usados na clínica, também a agricultura, a produção intensiva de aves, a suinicultura, a apicultura e a aquacultura, nas quais existe uma utilização de antibióticos para fins não terapêuticos, têm como consequência a seleção de estirpes bacterianas resistentes, aumentando os riscos de transferência dos respetivos determinantes genéticos para microrganismos patogénicos humanos. Vários estudos suportam de forma inequívoca a preocupação de que o uso de antibióticos (em doses subinibitórias) nos animais destinados ao consumo humano afetam a saúde, quer dos trabalhadores que contactam com estes animais quer do consumidor final (Aarestrup *et al*, 2008). Contudo, a relação entre o uso de antibióticos e a emergência, difusão e manutenção da resistência não é consensual, uma vez que o aumento da resistência bacteriana nem sempre é paralelo ao aumento do consumo de antibióticos e, por sua vez, a diminuição da resistência não está sempre relacionada com a sua restrição (Tenover, 2006).

Diversos antibióticos e genes de resistência têm origem em habitats onde evoluíram sem contacto com os seres humanos há centenas de milhares de anos. A força seletiva para a evolução de genes de resistência em ambientes naturais pode ter sido a presença de um dado composto tóxico (não necessariamente um antibiótico). No entanto, os determinantes que hoje contribuem para resistência em bactérias patogénicas pressupõe-se terem sido selecionados para fins metabólicos e mantidos em habitats com baixa pressão seletiva de antibióticos (Aleksun e Levy, 2007). A maioria dos estudos realizados sobre os efeitos da atividade humana na biosfera são baseados na análise de organismos superiores. No entanto, a maior parte da vida é microbiana e os efeitos das mudanças ambientais sobre a microbiota são amplamente ignorados. De facto, a poluição por antibióticos pode alterar o ambiente, ignorando-se, no entanto, que parte destas alterações podem permanecer a longo prazo (Martinez, 2009).

A introdução pelo Homem de antimicrobianos, em diferentes nichos ecológicos, contribui constantemente para o fenómeno de seleção de estirpes resistentes a antibióticos. A presença de bactérias resistentes, em animais selvagens de ambientes remotos, permite verificar até que ponto o fenómeno da resistência aos agentes antimicrobianos extravasa as fronteiras do ambiente hospitalar e se dissemina para áreas mais remotas do Globo. Independentemente da explicação para a dinâmica deste fenómeno estar relacionada com forças seletivas de evolução natural ou contaminação indireta por ação humana, uma consciencialização das repercussões desta disseminação para a saúde do ser humano e outros animais é uma mais-valia para a implementação de novas medidas que visem uma utilização mais adequada e eficaz dos antibióticos.

## CONCLUSÃO

A partir do século XX, a utilização dos antibióticos no combate às infecções bacterianas constituiu um grande passo na medicina moderna. No entanto, a resistência bacteriana não deu tréguas e rapidamente emergiu e se propagou. Assim, a resistência bacteriana não é um problema de cada indivíduo, mas sim um problema da sociedade, sendo por esse motivo essencial consciencializar a sociedade para este problema.

Recentemente têm sido desenvolvidos estudos em nichos extra hospitalares nos quais foram obtidos dados sobre a presença de resistência adquirida em microbiota comensal de vários animais selvagens, principalmente mamíferos e aves em diversos ambientes remotos. O estudo em animais selvagens tem assumido um papel relevante, na compreensão de mecanismos de resistência aos antibióticos, em ambientes aparentemente livres da ação do Homem e da influência dos agentes antimicrobianos. No entanto, parece não existir unanimidade quanto à explicação para este fenómeno, uma vez que determinados estudos apontam as causas para mecanismos de seleção natural de estirpes, enquanto outros atestam que este acontecimento se deve somente à circulação de genes de resistência através de forças físicas (ar, água) ou através do transporte por animais com potencial de contaminação a longas distâncias.

Os dados preliminares do limitado, mas muitíssimo importante, número de estudos aqui apresentados, evidenciam a necessidade de um estudo mais alargado e de uma análise mais aprofundada, com o objetivo de compreender e monitorizar o impacto de bactérias multiresistentes na vida selvagem, bem como a origem dos determinantes genéticos presentes no meio ambiente e fatores que contribuem para a sua seleção e disseminação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarestrup, F.M., Wegener, H.C. & Collignon, P. (2008) Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* **6**: 733-750.

Alekshun, M.N. & Levy, S.B. (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**: 1037-1050.

Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J. & Handelsman, J. (2010) Call of the Wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews. Microbiology* **8**: 251-259.

Alonso, A., Rojo, F. & Martinez, J. L. (1999) Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environmental Microbiology* **1**: 421-430.

Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Dell'Amico, E., Roselli, M., Strohmeyer, M., Barahona, H.G., Barrón, V.P., Paradisi, F. & Rossolini, G.M. (2004) High prevalence of acquired antimicrobial resistance unrelated to heavy consumption. *The Journal of Infectious Diseases* **189**: 1291-1294.

Bartoloni, A., Pallecchi, M., Benedetti, M., Fernandez, C., Vallejos, Y., Guzman, E., Villagran, A.L., Mantella, A., Lucchetti, C., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Bechini, A., Gamboa, H., Rodriguez, H., Falkenberg, T., Kronvall, G., Gotuzzu, E., Paradisi, F. & Rossolini, G.M. (2006) Multidrug-resistant commensal *Escherichia coli* in children, Peru and Bolivia. *Emerging Infectious Diseases* **12**: 907-913.

Bartoloni, A., Pallecchi, L., Rodriguez, H., Fernandez, C., Mantella, A., Bartalesi, F., Strohmeyer, M., Kristiansson, C., Gotuzzo, E., Paradisi, F. & Rossolini, G.M. (2009) Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community. *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**: 125-129.

Brownstein, D., Miller, M.A., Oates, S.C., Byrne, B.A., Jang, S., Murray, M.J., Gill, V.A. & Jessup, D.A. (2011) Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from sea otters (*Enhydra lutris*). *Journal of Wildlife Diseases* **47**: 278-292.

Brunton, L., Parker, K., Blumenthal, D. & Buxton I. (2008) Goodman e Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics. Nova Iorque, McGraw Hill.

Calvo, J. & Martínez, L.M. (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **27**: 44-52.

Case, C.L., Funke, B.R. & Tortora, G.J. (2000) Microbiologia. 6ª ed. Porto Alegre, Artmed **235**: 75-76.

Chaibi, E.B., Farzaneh, S., Peduzzi, J., Barthelemy, M. & Labia, R. (1996) An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases. *FEMS Microbiology Letters* **143**: 121-125.

Chen I., Christie P.J. & Dubnau D. (2005) The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* **310**: 1456-1460.

Cole, D., Drum, D.J., Stalknecht, D.E., White, D.G., Lee, M.D., Ayers, S., Sobsey, M. & Maurer, J.J. (2005) Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 935-938.

Dias, M., Monteiro, M.S. & Menezes, M.F. (2010) Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. *Clínica Farmacológica, Cadernos Otorrinolaringologia, Círculo Médico*.

Drobni, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Haeming, P. & Olsen, B. (2009) Vancomycin-Resistant Enterococci, Point Barrow, Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases* **15(5)**: 838-839.

Furuya, E. & Lowy, F. (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Medicine* **4**: 36-45.

Gilbert P., Allison, D. & Lambert, P. (2002) Antibiotics that act on nucleic acids and protein biosynthesis. *Molecular Medical Microbiology*. San Diego, California, Academic Press.

Gilliver, M.A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S.M. & Hart, C.A. (1999) Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature* **401**: 233-234.

Guimarães, S., Moura, D. & Silva, P.S. (2006) Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas - manual de farmacologia e farmacoterapia. 5ª edição, Porto Editora.

Hall, B.G. & Barlow, M. (2004) Evolution of the serine  $\beta$ -lactamases: past, present and future. *Drug Resistance Updates* **7**: 111-123.

Hall, R. & Collis, C. (1995) Mobile Gene Cassettes and Integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology* **15(4)**: 593-600.

Hawkey, P.M. (1998) The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *British Medical Journal* **317**: 657-660.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. & Kratz KL (1999) Occurrence of antibiotics in the environment. *Science Total Environment* **225**: 109-118.

Jarvis, W.R. (1987) Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients, Pediatric. *Infectious Disease Journal* **1**: 344-351.

Katzung, B.G., Masters, S.B. & Trevor, A.J. (2013) Farmacologia básica e clínica. 12ª edição, McGraw Hill Education.

Kayser, F.H. (1993) Evolution of resistance in microorganisms of human origin. *Veterinary Microbiology* **35**: 257-267.

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J. & Zinkernagel, R. M. (2005) Medical microbiology. 1ª ed., Stuttgart, New York, USA, Thieme.

Kelly, J. A., Dideberg, P., Charlier, P., Wery, J.P., Libert, M., Moews, P.C., Knox, J.R., Duez, C., Fraipont, C., Joris, B., Dusart, J., Frère, J.M. & Ghuysen, J.M. (1986) On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science* **231**: 1429-1431.

Kozak, G.K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R.J. & Jardine, C. (2001) Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environment International* **26**: 581-587.

Levy, S.B. (2002) Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal Applied Microbiology* **92**: 65-71.

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

Martinez, J.L. & Baquero, F. (2000) Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1771-1777.

Martinez, J.L. (2009) The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B* **276**: 2521-2530.

Mascaretti, O.A. (2003) Bacteria versus antibacterial agents: An integrated approach. ASM Press, Washington DC, USA.

Massova, I. & Mobashery, S. (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 1-17.

Mendes, M. (2012) Resistência a antibióticos em bactérias isoladas de animais selvagens de regiões remotas. Tese de Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Meroueh, S.O., Minasov, G., Lee, W., Shoichet, B.K. & Mobashery, S. (2003) Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 9612-9618.

Murray, B.E. (1997) Antibiotic Resistance. *Advances in Internal Medicine* **42**: 339-367.

Organização Mundial de Saúde (2012). A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Disponível em <[www.who.int/iris/bitstream/10665/3/OMS\\_IER\\_PSP\\_2012.2\\_por.pdf](http://www.who.int/iris/bitstream/10665/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf)>. [Consultado em 06/08/2014].

Osterblad, M., Norrdahl, K., Korpimäki, E. & Huovinen, P. (2001) Antibiotic resistance, How wild are wild mammals?. *Nature* **409**: 37-38.

Pallecchi, L., Lucchetti, C., Bartoloni, A., Bartalesi, F., Mantella, A., Gamboa, H., Carattoli, A., Paradisi, F. & Rossolini, G.M. (2007) Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 1179-1184.

Patak, S.P. & Gopal, K. (2007) Bacterial contamination and antibiotic resistance in fecal coliforms from glacial water runoff. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **79**: 163-167.

Pereira, A.L. & Pita, J.R. (2005) Alexandre Fleming na imprensa portuguesa in "Comunicações". II Congresso Luso-brasileiro de Estudos Jornalísticos / IV Congresso Luso-galego de Estudos Jornalísticos, Porto.

Pérez-Cano, H.J. & Robles-Contreras, A. (2013) Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica* **3**: 186-191.

Rahman, M.H., Sakamoto, K.Q., Nonaka, L. & Suzuki, S. (2008) Occurrence and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enteric bacteria of Antarctic Adélie penguins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: 627-628.

Sánchez, B.P., Muñoz, M. R. & Gutiérrez, M.N.P. (2012) Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Spei Domus* **8(17)**: 31-37.

Schierack, P., Römer, A., Jores, J., Kaspar, H., Guenther, S., Filter, M., Eichberg, J. & Wieler, L.H. (2009) Isolation and Characterization of Intestinal *Escherichia coli* Clones from Wild Boars in Germany. *Applied and Environmental Microbiology* **75(3)**: 695-702.

Sefton A. M. (2002) Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. *Drugs* **62**: 557-566.

Sjölund, M., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Bengtsson, S., Cederbrant, G., Pinhassi, J., Kahlmeter, G. & Olsen, B. (2008) Dissemination of Multidrug-Resistant Bacterial into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases* **14(1)**: 70-71.

Sousa, J.C., Peixe, L.V., Ferreira, H., Pinto, M.E., Nascimento, M.S.J., Sousa, M.I. & Cabral, M. (1998) Antimicrobianos. In *Microbiologia* (Eds. W. F. C. Ferreira & J. C. Sousa), Lisboa, Lidel, pp. 239-269.

Spinosa, H., Góniak, S.L. & Bernardi, M.M. (2006) *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 4ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z. & Hameed, S. (2014) Multidrug resistance: an emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2014:541340.

Tavares, W. (2000) Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **3**: 281-301.

Tenover, F.C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* **34**: 3-10.

Thaller, M.C., Migliore, L., Marquez, C., Tapia, W., Cedeño, V., Rossolini, G.M. & Gentile, G. (2010) Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galápagos land iguanas: no man, no resistance. *PLoS ONE* **5(2)**: e8989.

Tollefson, L. & Karp, B.E. (2004) Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Médecine et Maladies Infectieuses* **34**: 514-521.

Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L. (2012) In: Microbiologia, 10ªed. Porto Alegre, Artmed.

Veiga, C.L. (1984) Os antibióticos na prática clínica. Lisboa, Cooperativa Editora Infecon.

Ventura M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Charter, K.F. & van Sinderen, D. (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**: 495-548.

Vizváryová, M. & Valková, D. (2004) Transposons - the useful genetic tools. *Biologia, Bratislava* **59(3)**: 309-318.

Walsh, C. (2003) Antibiotics that block DNA replication and repair: the quinolones. *American Society for Microbiology*, Washington DC.

Walson, J. L., Marshall, B., Pokhrel, B. M., Kafle, K. K. & Levy, S. B. (2001) Carriage of antibiotic-resistant fecal bacteria in Nepal reflects proximity to Kathmandu. *Journal of Infectious Diseases* **184**: 1163-1169.