

Joana Raquel Almeida Gomes

Carbapenemases em bacilos de Gram negativo: diversidade e impacto clínico

Universidade Fernando Pessoa,

Porto, 2017

Carbapenemases em bacilos de Gram negativo: diversidade e impacto clínico

Joana Raquel Almeida Gomes

Carbapenemases em bacilos de Gram negativo: diversidade e impacto clínico

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

Joana Raquel Almeida Gomes

Carbapenemases em bacilos de Gram negativo: diversidade e impacto clínico

(Joana Raquel Almeida Gomes)

“Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêutica”

Sumário

O aumento de bactérias resistentes a antibióticos envolvidas em doenças infecciosas é um dos temas mais preocupantes da atualidade. Em particular, tem sido alarmante o aumento de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. resistentes a antibióticos β -lactâmicos do grupo dos carbapenemos. A resistência aos carbapenemos em bacilos de Gram negativo está fundamentalmente associada a genes que codificam para carbapenemases, isto é, β -lactamases com capacidade para hidrólise sobre carbapenemos, inativando a sua ação. Atualmente existe uma grande diversidade de carbapenemases, existindo esquemas de classificação que facilitam o seu agrupamento de acordo com algumas características que partilham.

Muitos dos genes que codificam para carbapenemases têm sido fundamentalmente associados a plasmídeos, o que contribui para a sua rápida disseminação entre diferentes grupos bacterianos e nichos (unidades de cuidados de saúde/comunidade). Adicionalmente, estes plasmídeos albergam também frequentemente genes de resistência a outras famílias de antibióticos (quinolonas, aminoglicosídeos, entre outros), conduzindo a fenótipos de MDR, XDR e PDR. Esta situação tem um impacto clínico assinalável, uma vez que fica não só comprometido o uso de antibióticos β -lactâmicos (muito eficazes e pouco tóxicos), mas também de antibióticos de outras famílias, no tratamento das infeções por bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases.

A epidemiologia global de algumas espécies de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases é hoje conhecida, embora existam diferenças geográficas assinaláveis.

Nos últimos anos os isolados bacterianos produtores de carbapenemases têm-se disseminado globalmente, surgindo por isso uma preocupação cada vez maior face às elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas. Trata-se de microrganismos associados a infeções nosocomiais graves, a elevadas taxas de mortalidade e de difícil tratamento, sendo muito escassas as opções terapêuticas eficazes. As evidências apontam que a medida mais eficaz no combate às infeções hospitalares é a higienização das mãos, sendo esta uma prática fundamental para a redução da disseminação da resistência bacteriana. Ao associar a isto medidas de limpeza e desinfeção de superfícies contribui-se de forma efetiva para evitar e minimizar o surgimento de reservatórios

ambientais e fontes de infecção. Para evitar surtos hospitalares por estas bactérias podem ser feitos a rastreios de colonização intestinal.

As bactérias produtoras de carbapenemases representam uma grande ameaça para a saúde humana em todo o mundo e constituem um dos problemas mais desafiadores para a contenção de doenças infecciosas nos próximos anos.

Como alternativas terapêuticas para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases restam as polimixinas (por exemplo, colistina) e a tigeciclina. As polimixinas permanecem ativas contra a maioria destes isolados multirresistentes, no entanto, já começam a surgir resistências à colistina decorrentes do aumento do seu uso.

Palavras-chave: antibióticos β -lactâmicos, resistência a carbapenemos, β -lactamases, carbapenemases, metalo- β -lactamases, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* sp.

Abstract

The increase of antibiotic resistant bacteria involved in infectious diseases is one of the most worrying issues today. In particular, it has been alarming the increase of *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp. and *Pseudomonas* sp. resistant to β -lactam antibiotics of the carbapenem group. Resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli is mainly associated with genes encoding carbapenemases, that is, β -lactamases capable of hydrolysis over carbapenems, inactivating their action. Currently there is a great diversity of carbapenemases, and some classification schemes were created to facilitate their grouping according to some characteristics that they share.

Many of the genes encoding carbapenemases have been associated with plasmids, contributing to their rapid spread between different bacterial groups and niches (health care / community units). In addition, these plasmids also frequently harbor resistance genes to other families of antibiotics (quinolones, aminoglycosides, amongst others), leading to MDR, XDR and PDR phenotypes. This situation has a remarkable clinical impact, since not only the use of β -lactam antibiotics (very effective and not very toxic), but also antibiotics of other families, is compromised in the treatment of the infections by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli.

The global epidemiology of some species of Gram-negative bacilli producing carbapenemases is now known, although there are marked geographical differences.

In recent years, bacterial isolates producing carbapenemases have spread globally, resulting in increasing concern about the high rates of morbidity and mortality. These are microorganisms associated with serious nosocomial infections, with high mortality rates and difficult to treat, with very few effective treatment options. The evidence indicates that the most effective measure in the fight against hospital infections is hand hygiene, a key practice in reducing the spread of bacterial resistance. By associating with this, measures of cleaning and disinfection of surfaces contribute in an effective way to avoid and minimize the appearance of environmental reservoirs and sources of infection. To prevent hospital outbreaks by these bacteria, intestinal colonization screenings can be done.

Carbapenemases pose a major threat to human health throughout the world and are one of the most challenging problems for the containment of infectious diseases in the coming years.

Therapeutic alternatives for treating infections caused by carbapenemase-producing bacteria include polymyxin (for example, colistin) and tigecycline. Polymyxins remain active against most of these multiresistant isolates; however, resistance to colistin has begun to emerge due to increased use.

Keywords: β -lactam antibiotics, carbapenems resistance, β -lactamases, carbapenemases, metallo- β -lactamases, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Acinetobacter* sp.

Dedicatórias

O mais importante não é somente o ato de trabalhar,
mas quando o resultado do teu trabalho gera
reconhecimento.

Ezequiel Redin

Dedico aos meus país, irmão e namorado,
por valorizarem tudo quanto sou no mínimo que faço,
por acreditarem sempre em mim e
por todo o apoio que sempre demonstraram.

Agradecimentos

As minhas primeiras palavras vão para a minha família, em especial os meus pais, pelo esforço que sempre fizeram para que eu concretizasse um dos meus sonhos. Por tudo o que fizeram por mim, obrigado.

As segundas vão para a Prof^a Doutora Elisabete Machado, à qual agradeço todos os conselhos, força e dedicação que me ofereceu em toda a orientação desta etapa final.

Não posso deixar de agradecer a todos os docentes que contribuíram para a minha formação, dando-me oportunidade de crescer, humanamente e profissionalmente, como farmacêutica.

A todos, o meu muito obrigado!

Índice

Índice de figuras	XII
Lista de abreviaturas	XIII
Objetivos e Metodologia	XIV
I. Contextualização histórica e conceitos gerais sobre os antibióticos	1
II. Antibióticos β -lactâmicos	5
1. Estrutura química	6
2. Mecanismo de ação	7
3. Mecanismos de resistência bacteriana	9
3.1 Resistência através da produção de β -lactamases: Classificação das β -lactamases	12
III. Carbapenemases	14
1. Diversidade	14
2. Propriedades enzimáticas gerais e específicas.....	15
3. Principais grupos bacterianos produtores de carbapenemases	16
3.1 Epidemiologia de <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> produtores de carbapenemases	19
4. Impacto clínico e novas opções terapêuticas para <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> produtores de carbapenemases.....	22
Conclusão	28
Bibliografia.....	29

Índice de figuras

Figura 1- Consumo de antibióticos em ambulatório na Europa em 2015.....	2
Figura 2- Locais de atuação dos diferentes grupos de antibióticos usados na terapêutica humana.....	3
Figura 3- Estrutura química do anel β -lactâmico	6
Figura 4- Estrutura química dos β -lactâmicos	7
Figura 5- Interação β -lactâmico / transpeptidase	8
Figura 6- Mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias contra os antibióticos β -lactâmicos	10
Figura 7- Parede celular de bactérias de Gram negativo e de Gram positivo	11
Figura 8- Exemplos de β -lactamases segundo a classificação de Ambler.....	13
Figura 9- Epidemiologia de <i>Enterobacteriaceae</i> produtores de carbapenemases na Europa.....	17
Figura 10- Epidemiologia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> produtores de carbapenemases na Europa.....	17
Figura 11- Epidemiologia de <i>Acinetobacter baumannii</i> produtores de carbapenemases na Europa.....	18

Lista de abreviaturas

DHD: Dose Diária Definida por 1000 Habitantes por Dia

ECDC: Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ESBLs: β -lactamases de espectro alargado

KPCs: Carbapenemases de *Klebsiella pneumoniae*

MBLs: Metallo- β -lactamases

MDR: Multirresistente a antibióticos do inglês *Multidrug-resistant*

MRSA: *S. aureus* resistentes à Meticilina

OXAs: Oxacilinases

PDR – Pan-resistente a antibióticos do inglês *Pandrug-resistant*

PBPs: Proteínas de ligação à penicilina do inglês *Penicillin binding proteins*

VRE - *Enterococcus* resistentes à vancomicina

XDR: Extensivamente resistente a antibióticos do inglês *Extensively drug resistant*

Objetivos e Metodologia

Com este trabalho pretende-se efetuar uma revisão bibliográfica acerca da diversidade e impacto clínico atual de bacilos de Gram negativo produtores de carbapenemases, abordando ainda alguns aspetos epidemiológicos a nível mundial e nacional. Para tal foi efetuada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed, Google académico e b-on utilizando as palavras-chave: “ β -lactamic antibiotic”, “carbapenem resistance”, “ β -lactamases”, “carbapenemases”, “metalo- β -lactamases”, “*Enterobacteriaceae*”, “*Pseudomonas aeruginosa*” e “*Acinetobacter sp.*” com as quais foram obtidos alguns artigos. Dos artigos inicialmente encontrados foram selecionados trinta disponíveis em texto integral, por serem os mais relacionados com o tema em questão. Foi ainda recolhida informação em três livros. O espaço temporal da pesquisa foi restringido a 2010-2017, tendo sido também necessária a pesquisa de artigos de anos anteriores para contextualização histórica.

I. Contextualização histórica e conceitos gerais sobre os antibióticos

O termo antibiótico resulta da combinação de duas palavras gregas, *antí* que significa contra e *bios*, vida (contrário à vida). Em 1942, Selman Waksman definiu antibiótico como uma substância produzida por microrganismos, tais como bactérias e fungos, capazes de inibir o crescimento e até destruir outros organismos. Algumas bactérias produzem antibióticos para se defenderem, mas de forma a evitar a sua morte necessitam de mecanismos de autoproteção, como por exemplo a modificação da sua própria estrutura, principalmente ao nível da parede celular a fim de escaparem aos efeitos dos antibióticos por elas produzidos. Por outro lado estes compostos podem ser usados na terapêutica para o tratamento de infeções causadas por microrganismos, desde que não apresentem efeitos nocivos consideráveis sobre o hospedeiro infetado (Sousa *et al*, 2016b).

No início da era dos antibióticos, o bacteriologista Alexander Fleming, verificou que uma das suas placas com culturas de *Staphylococcus aureus* apresentava um halo de inibição de crescimento. Tal aconteceu porque o fungo *Penicillium notatum* tinha contaminado as placas e consequentemente tinha destruído as bactérias por produzir um composto antibacteriano, que ficou conhecido por penicilina (Ligon, 2004). Em 1939 Florey e Chain decidiram retomar a investigação de Fleming e, devido ao seu talento, conseguiram purificar e determinar a eficácia clínica da penicilina (Suárez e Gudiol, 2009). Tudo isto desencadeou um avanço extraordinário para a medicina, possibilitando a aplicação clínica da penicilina e a sua produção à escala industrial. No entanto, várias bactérias de Gram positivo e de Gram negativo começaram a produzir enzimas inativadoras das penicilinas, as chamadas penicilinases, deixando estes agentes terapêuticos de resultar. Isto levou ao desenvolvimento de outros antibióticos β -lactâmicos, como as isoxazolilpenicilinas (penicilinas semissintéticas), usadas para escapar a este tipo de β -lactamases e mais tarde as cefalosporinas. Começaram a surgir também resistências a esta classe de fármacos, principalmente devido à produção de cefalosporinases de espectro alargado, enzimas que degradam cefalosporinas de espectro alargado, (também conhecidas por β -lactamases de espectro alargado - ESBLs) mediadas por plasmídeos (Sousa *et al*, 2016b). Já nesta época os carbapenemos eram os únicos antibióticos β -lactâmicos ativos contra estirpes bacterianas produtoras de β -lactamases de espectro alargado, mas o seu uso inapropriado e inadequado também levou à resistência em espécies de *Enterobacteriaceae* e em outros bacilos de Gram

Os antibióticos antibacterianos podem ser classificados como: i) naturais, sendo estes, produtos do metabolismo secundário de microrganismos (por exemplo: penicilina G); ii) sintéticos, quando obtidos por síntese química (por exemplo: sulfamidas); e iii) semissintéticos, quando produzidos através de culturas de microrganismos que são posteriormente modificadas quimicamente (por exemplo: ampicilina). Inicialmente os produtos naturais com ação antimicrobiana foram designados de antibióticos e os produtos de síntese de quimioterápicos. Com o passar dos anos começaram a surgir cada vez mais moléculas de síntese e o termo antibiótico passou a englobar todos os compostos naturais ou de síntese com propriedades de antibiose (Sousa *et al*, 2016b).

A maioria dos fármacos usados em medicina são organotrópicos, ou seja, o efeito terapêutico resulta da sua ação direta sobre o organismo humano. No entanto os antibióticos não se destinam a influenciar qualquer atividade biológica do organismo humano. Eles atuam sobre os agentes patogênicos para o organismo humano de modo a impedir o seu crescimento ou a provocar a sua morte. São por isso classificados como fármacos etiotrópicos. Os diferentes grupos de antibióticos antibacterianos têm um alvo específico na célula bacteriana, como se pode observar na Figura 2, o que os dota de propriedades de antibiose (Sousa *et al*, 2016b).

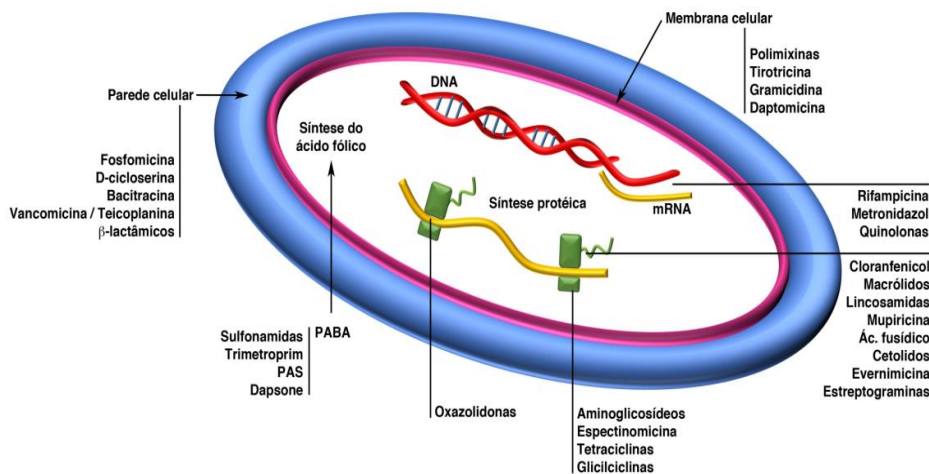


Figura 2. Locais de atuação dos diferentes grupos de antibióticos usados na terapêutica humana (adaptado de Sousa *et al*, 2016b).

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevantes, uma vez que as bactérias que se alojam no organismo humano estão cada vez mais resistentes aos antibióticos que se usam na terapêutica. Segundo os dados mais recentes do Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (ECDC), Portugal ocupa o 16.º lugar entre os países europeus com maior consumo de antibióticos (21,3 DHD - dose diária definida por 1000 habitantes por dia). Ao observar com algum detalhe a Figura 1 percebe-se que Portugal apresenta valores do consumo de antibióticos de última geração muito semelhantes à média europeia (22,4 DHD). Em Portugal tem-se observado uma crescente resistência de *K. pneumoniae* a cefalosporinas de terceira geração e a carbapenemos, e de *Escherichia coli* a quinolonas, sendo também considerado um dos países com elevada taxa de resistência de *A. baumannii* a vários antimicrobianos (ECDC, 2015).

Sabe-se portanto que a resistência bacteriana tem sofrido um crescimento acentuado, sendo a maioria dos isolados de *Enterobacteriaceae* e de bacilos de Gram negativo não fermentadores (principalmente *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp) produtores de carbapenemases, resistentes a praticamente todos os β -lactâmicos e a outras classes de antibióticos, o que limita severamente as opções terapêuticas. Sabe-se hoje que, para problemas de multirresistência envolvendo espécies de *Enterobacteriaceae* e bacilos de Gram negativo não fermentadores, como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. é necessário considerar, para além da disseminação de estirpes resistentes, a disseminação dos seus genes de resistência através de plasmídeos e a propagação destes entre estirpes, espécies e géneros bacterianos (Woodford *et al*, 2013).

À semelhança do que acontece a nível mundial, as espécies bacterianas, agentes de infeção mais resistentes aos antibióticos em Portugal são: *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL ou de carbapenemases, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistentes aos carbapenemos, *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) e *Streptococcus pneumoniae* resistentes à penicilina. Apesar de em anos recentes se verificar uma diminuição do consumo de antibióticos em Portugal (ECDC, 2015; Loureiro *et al*, 2016), este não deixa de ser, no contexto europeu, um país com um elevado consumo de antibióticos, pelo que é importante tomar medidas no sentido de reduzir o consumo destes agentes terapêuticos. O aumento do nível de resistências aos antibióticos é resultado da ineficácia dos mais recentes antibacterianos devido ao aparecimento de cada vez mais bactérias multirresistentes, ao uso irracional e

inadequado dos antibióticos (em particular a sua utilização excessiva) e à incapacidade das indústrias farmacêuticas em introduzirem no mercado novas moléculas, o que faz com que muitas doenças infecciosas se possam tornar intratáveis num futuro próximo (Ashkenazi, 2013; Loureiro *et al*, 2016).

A prescrição inadequada de antibióticos devido principalmente à incerteza no diagnóstico; a não adesão à terapêutica por parte dos doentes, que muitas vezes não cumprem com a posologia ou fazem o tratamento por períodos diferentes do que foi prescrito, e que muitas vezes se automedicam utilizando antibióticos de tratamentos anteriores ou adquirindo a medicação na farmácia sem prescrição médica, contribuem, de facto, para o problema da resistência bacteriana. Tudo isto fez com que fosse criada uma pressão seletiva, permitindo que estirpes resistentes se espalhassem com facilidade, contribuindo assim para o aumento da prevalência e incidência de doenças infecciosas. Trata-se portanto de um sério problema de saúde pública que apresenta custos elevados para todos os cidadãos e consequências nocivas para a saúde, tais como diminuição da eficácia dos tratamentos, prolongamento das doenças, aumento do número de hospitalizações e da morbidade e mortalidade (Loureiro *et al*, 2016).

O mais caricato é que 50% da totalidade de antibióticos consumidos na União Europeia não são utilizados em humanos mas sim em atividades como veterinária, zootecnia e pecuária. É ainda de salientar que quando estes agentes antimicrobianos são eliminados, pelo homem, através de processos fisiológicos, e da eliminação de detritos industriais resultantes, por exemplo, da indústria farmacêutica e agropecuária, favorecem a disseminação de genes de resistência entre as bactérias dos solos e dos meios aquáticos, pois criam um *stress* ambiental que pode ter um grande impacto nas infeções humanas (Loureiro *et al*, 2016; Sousa *et al*, 2016a).

II. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos devido à sua elevada eficácia terapêutica, baixa toxicidade e ação bactericida são o grupo de antibióticos mais utilizados em clínica, sobretudo em infeções por bactérias de Gram negativo, tais como *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., e diversas espécies de *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* sp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., entre outras). Este grupo de antibióticos apresenta uma ação bactericida lenta, impedindo a síntese do peptidoglicano, um componente que existe na parede

celular das bactérias e que não se encontra nas células humanas. Este é o mecanismo de ação que justifica a toxicidade seletiva deste grupo de antibióticos para as células bacterianas (Rapp e Urban, 2012; Woodford *et al*, 2013; Sousa *et al*, 2016c).

1. Estrutura química

Os antibióticos β -lactâmicos têm a característica comum de exibir um anel β -lactâmico, indispensável à sua ação antibacteriana, constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio (Figura 3), e que pode ter diversos radicais substituintes que o tornam ativo (Figura 4) (Sousa, 2001; Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016c).

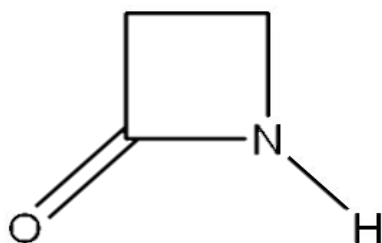


Figura 3. Estrutura química do anel β -lactâmico (fonte: <http://www.icb.usp.br>).

Este grupo de antibióticos não tem uma família homogénea, isto é, apesar de todos possuírem o anel β -lactâmico, podem conter diferentes tipos de cadeias lineares, o que leva à alteração das suas características, espectros de ação e resistência às β -lactamases (ver mais adiante). Como se pode observar na Figura 4, existem quatro subfamílias de β -lactâmicos, designadas de penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenemos (Sousa, 2006; Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016c).

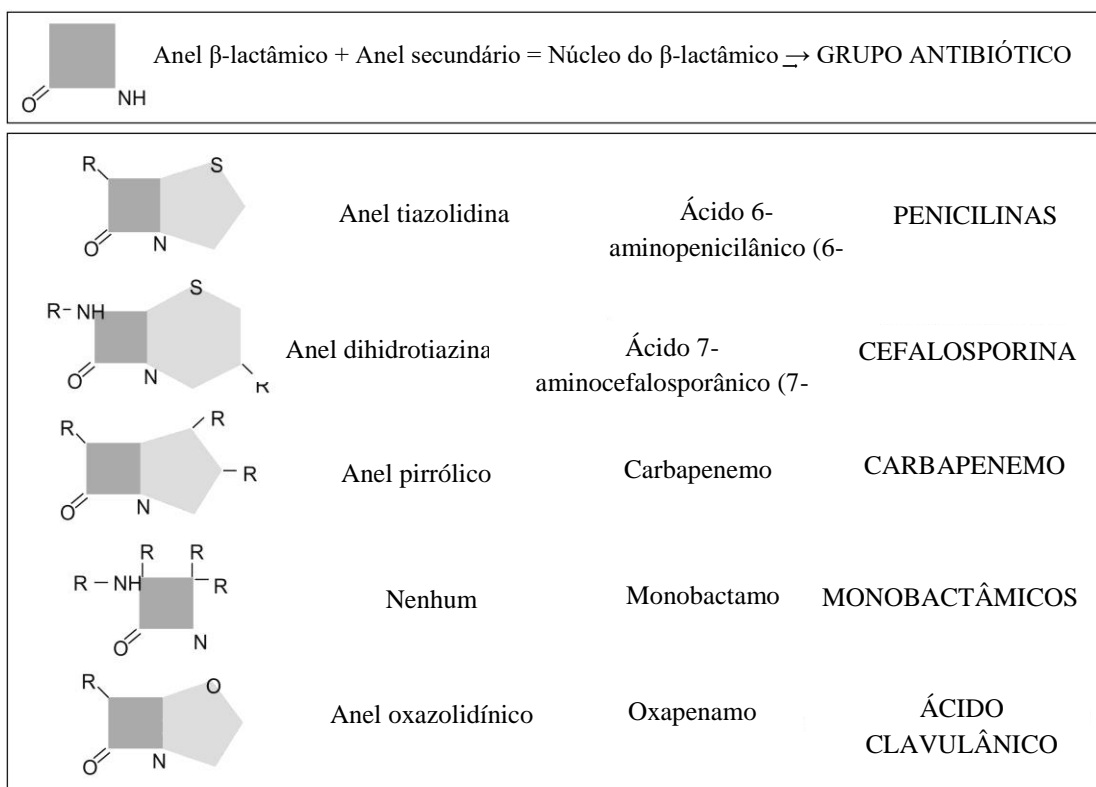


Figura 4. Estrutura química dos β -lactâmicos (adaptado de Suárez e Gudíol, 2009).

2. Mecanismo de ação

Os antibióticos antiparietais são agentes terapêuticos muito usados em clínica, contribuindo para isso o facto de se tratar de um grupo de antibióticos muito numeroso, que atua tanto em bactérias de Gram negativo como de Gram positivo. Assim, devido à versatilidade em termos de microrganismos em que podem ser usados, o comprometimento da sua eficácia é grave, pois restam poucas alternativas para combater as estirpes multirresistentes que vão surgindo a um ritmo cada vez maior. Este grupo de antibióticos apresenta também baixa toxicidade e um mecanismo de ação bactericida, podendo ser usado em indivíduos imunodeprimidos, o que não acontece com os antibióticos bacteriostáticos (Suárez e Gudíol, 2009).

Os antibióticos antiparietais inibem a síntese do peptidoglicano, atuando em várias fases da biossíntese desta macromolécula, que é o principal constituinte da parede celular das bactérias. Os antibióticos que inibem a síntese do peptidoglicano na fase citoplasmática (por exemplo: fosfomicina) necessitam de atravessar a membrana celular da bactéria para exercerem a sua ação. Os antiparietais que atuam na fase membranar da biossíntese do peptidoglicano (por exemplo: vancomicina) ou na fase parietal (por exemplo: β -lactâmicos) afetam a organização da parede celular, não necessitando por

isso de atravessar a membrana celular bacteriana para exercerem as suas propriedades de antibiose (Sousa *et al*, 2016b).

Os *Penicillin Binding Proteins* (PBPs) (enzimas como transpeptidases, transglicolases e carboxipeptidases) são reconhecidos como alvos pelos antibióticos β -lactâmicos. Estes, ao ligarem-se a estas enzimas, impedem a formação e maturação do mucopeptídeo da parede celular bacteriana (Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016c).

Os antibióticos β -lactâmicos inibem os PBPs por um mecanismo que envolve a acilação do grupo serina que existe no centro ativo do domínio transpeptidase dos PBPs. Com a desacilação lenta que ocorre, tem-se uma inativação dos PBPs quase irreversível, que se torna suficiente para impedir o crescimento bacteriano (Sousa *et al*, 2016c).

A capacidade das bactérias em controlar a integridade da parede celular é afetada, uma vez que os complexos formados (β -lactâmico-transpeptidase) apesar de estáveis são inativos (Figura 5). Existe portanto uma certa analogia estrutural entre a molécula β -lactâmica e a porção terminal D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica do peptidoglicano, o que ilude os PBPs e faz com que se liguem ao antibiótico β -lactâmico. O domínio transpeptidase dos PBPs tem maior afinidade para o anel β -lactâmico do que para o seu substrato natural (D-alanina), sendo desta forma desviada a sua função de maturação da parede celular da bactéria (Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016c).

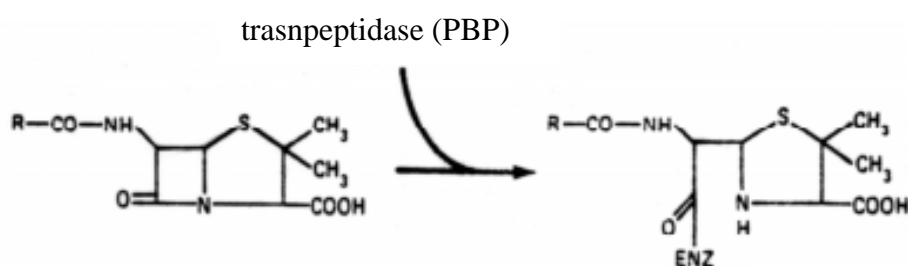


Figura 5. Interação β -lactâmico / transpeptidase (adaptado de Sousa, 2006)

Os antibióticos β -lactâmicos ao inativarem os PBPs levam à paragem da síntese da parede celular e consequentemente à morte da bactéria. Quando a atividade destes

agentes terapêuticos é comprometida por mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias, surge muitas vezes ineficácia terapêutica, ficando estes agentes incapazes de exercer o seu efeito (Sousa *et al*, 2016d).

Como agentes bactericidas, os β -lactâmicos exercem o seu efeito através de dois mecanismos: por inibição da síntese da parede celular bacteriana (efeito bacteriostático) e/ou por indução da autólise bacteriana (efeito bactericida), que cria na parede celular locais frágeis, por quebra das ligações covalentes do peptidoglicano existente.

Quando os agentes antibacterianos são capazes de permear a parede celular bacteriana e procedem à acilação dos PBPs, inibindo a síntese do peptidoglicano e ativando a autólise, ocorre uma alteração no balanço fisiológico entre as autolisinas e os PBPs. No caso de uma bactéria de Gram positivo, a bactéria expulsa os ácidos lipoteicóicos para o meio externo, e a síntese da parede celular acaba por não continuar, o que leva à perda do controlo da atividade autolítica endógena, que resulta no efeito bactericida (Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016b).

3. Mecanismos de resistência bacteriana

A resistência aos antibióticos é vista como resposta natural das bactérias à exposição a estes agentes terapêuticos e é definida como a capacidade de resistir às concentrações clínicas do antibiótico. Atualmente, a fácil transferência de bactérias e/ou genes de resistência através da produção animal, cuidados de saúde (hospitalares e outros), comunidade e/ou viagens internacionais, associada com as constantes mutações espontâneas em genes bacterianos, promovem a rápida disseminação de bactérias que albergam mecanismos de resistência aos antibióticos (Davies e Davies, 2010; Infarmed, 2016).

As bactérias conseguem evitar os efeitos dos antibióticos β -lactâmicos através de 4 mecanismos (Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016d), representados na Figura 6:

- Impermeabilização da membrana externa, que leva à redução da quantidade de β -lactâmicos que atinge o alvo, por redução da sua entrada na célula bacteriana;
- Modificação dos alvos (PBPs), devido à perda total de afinidade, à sua simples redução, ou até aquisição de novos PBPs;

- Hidrólise do anel β -lactâmico mediada por mecanismos enzimáticos (β -lactamases) que inativam total ou parcialmente o antibiótico;
- Aumento da expulsão de antibiótico do espaço periplasmático para o exterior da bactéria devido à expressão de bombas de efluxo (proteínas transportadoras).

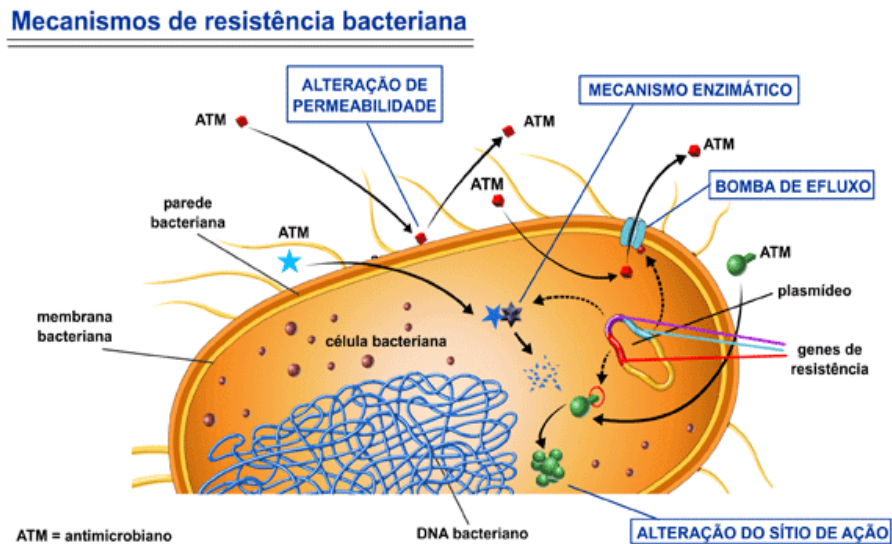


Figura 6. Mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias contra os antibióticos β -lactâmicos (fonte: <http://www.brasilecola.com/biologia/resistencia-das-bacterias-aos-antibioticos.htm>)

Estes mecanismos de resistência podem ocorrer individualmente ou em associação e variam com diversos fatores, como ocorrência natural, distribuição geográfica, base genética, entre outros.

O mecanismo de resistência aos β -lactâmicos mais importante em bactérias de Gram negativo é a produção de β -lactamases, enzimas bacterianas que hidrolisam o anel β -lactâmico, protegendo assim os microrganismos dos efeitos letais dos antibióticos β -lactâmicos (Bush, 2010; Rapp e Urban, 2012; Sousa *et al*, 2016d). A produção destas enzimas bacterianas pode ser mediada por plasmídeos, onde são transferidos os genes que codificam enzimas geralmente inativadas por inibidores de β -lactamases (alguns exemplos são as ESBLs produzidas por *E. coli*, *K. pneumoniae*, entre outras) ou podem ser cromossomicamente codificadas (β -lactamases do tipo AmpC), como as produzidas por *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., entre outras. Neste último caso, ocorre muitas vezes um aumento da sua produção depois da exposição a antibióticos β -lactâmicos (em especial a uma cefalosporinas de 2ª geração, a cefoxitina) ou mesmo

após exposição a alguns inibidores de β -lactamases (principalmente ao ácido clavulânico) (Suárez e Gudiol, 2009).

As modificações ao nível do alvo dos antibióticos β -lactâmicos (PBPs) são o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bactérias de Gram positivo, como *S. pneumoniae*, *S. aureus* e *Enterococcus faecium*. Tem pouca relevância clínica em bactérias de Gram negativo, a não ser que ocorra associação com outros mecanismos de resistência, por exemplo a impermeabilização da membrana externa ou com a expulsão das moléculas de antibiótico por bombas de efluxo (Suárez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016d).

O mecanismo de resistência por impermeabilização da membrana externa, embora de menor relevância, é também mais importante em bactérias de Gram negativo, uma vez que a parede celular destas bactérias é mais complexa que a das bactérias de Gram positivo (Figura 7). A membrana externa presente na parede celular das bactérias de Gram negativo funciona como uma barreira à permeabilidade. Como outras membranas biológicas, a membrana externa é fundamentalmente constituída por lípidos, o que lhe confere pouca permeabilidade para compostos hidrofílicos, sendo que estes compostos, onde estão incluídos os β -lactâmicos, necessitam de canais de porina (canais aquosos de difusão à base de proteínas que só existem na membrana externa) que lhes facilitem a entrada para o periplasma de modo a atingirem o seu alvo (Nikaido, 2003; Suarez e Gudiol, 2009; Sousa *et al*, 2016d e e).

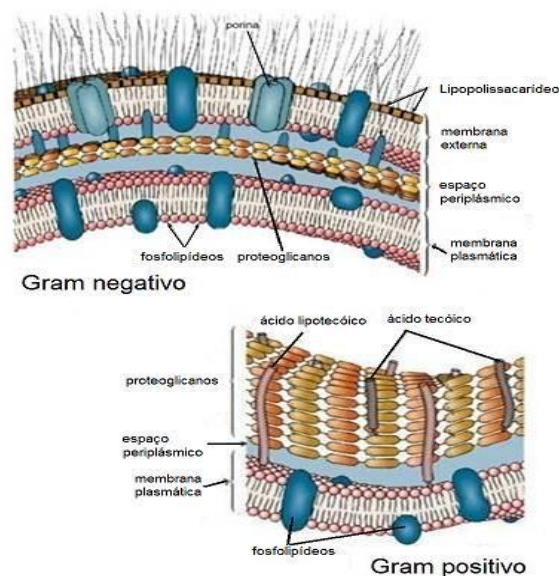


Figura 7. Parede celular de bactérias de Gram negativo (em cima) e de Gram positivo (em baixo) (fonte: <http://www.abcdamedicina.com.br>)

Este mecanismo de resistência é bastante atual, ouvindo-se frequentemente falar de uma redução da entrada de antibióticos β -lactâmicos na célula bacteriana. Tal sucede devido à existência de canais de porina inadequados a certos antibióticos β -lactâmicos, daí a resistência natural por exemplo de *E. coli* à Penicilina, que tendo carga elétrica não entra nos canais de porina. Por outro lado pode dever-se à diminuição do número de canais de porina ou a alterações funcionais dos mesmos que resultam de resistência adquirida (Fernández *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2016d). Como exemplos disto tem-se a diminuição da susceptibilidade de *P. aeruginosa* a vários carbapenemos por perda da porina OprD (Nikaido, 2003; Breilh *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2012); a resistência aos carbapenemos em *A. baumannii* por perda de porinas CarO (Fernández *et al.*, 2012), entre outros. Atualmente sabe-se que a diminuição do número de canais de porina pode ser devida a mutações no gene que codifica para porinas ou em genes reguladores do mesmo (Fernández *et al.*, 2012).

A inativação do antibiótico por β -lactamases e a expulsão do antibiótico para o exterior da célula bacteriana por bombas de efluxo são mecanismos de resistência quase exclusivos de bactérias de Gram negativo, sendo que o primeiro apresenta maior impacto clínico. O segundo envolve proteínas transportadoras que impedem que o antibiótico chegue ao seu alvo bacteriano, porque é imediatamente expulso pelas bombas de efluxo. Isto permite à bactéria prevenir a acumulação intracelular de compostos tóxicos (Sousa *et al.*, 2016d).

3.1 Resistência através da produção de β -lactamases: Classificação das β -lactamases

Segundo Rapp e Urban (2012) desde o final de 2009 foram determinadas mais de 890 sequências de proteínas correspondentes a β -lactamases, surgindo por isso a necessidade da sua classificação. Não foi uma tarefa fácil, pois o aparecimento de novas β -lactamases tem levado a novas classificações e atualizações constantes. A classificação de β -lactamases pode ser baseada na sua estrutura molecular (Classificação de Ambler - 1980), ou em características funcionais (Esquema de Bush-Jacoby-Medeiros – 2010), ou numa combinação de ambos. O esquema de Bush classifica as β -lactamases de acordo com os seus substratos prediletos e perfil dos seus inibidores. Já o esquema estrutural de Ambler classifica as β -lactamases de acordo com as diferenças encontradas no centro ativo destas enzimas e as diferenças nas suas

sequências de aminoácidos. As β -lactamases das classes A, C e D de Ambler utilizam serina no seu centro ativo para hidrólise do substrato, sendo conhecidas por serino- β -lactamases, enquanto as β -lactamases da classe B necessitam de iões de zinco divalentes para hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos, sendo também conhecidas por metalo- β -lactamases (MBLs). Estas enzimas de classe B não são inibidas pelos inibidores clássicos das β -lactamases (por exemplo, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), nem pelo ácido borónico, nem pelo avibactam (inibidor das β -lactamases sem estrutura β -lactâmica), mas sim pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pelo ME1071 que é um novo inibidor específico para MBLs derivado do ácido maleico, e por agentes quelantes tri- e tetra- do ácido acético. O aztreonamo, único monobactamo utilizado na terapêutica, quando usado em monoterapia tem a particularidade de ser ativo contra bactérias produtoras de MBLs, porque não é hidrolisado por estas carbapenemases (Bush *et al*, 1995; Bush e Jacoby, 2010; Ramos, 2010; Rapp e Urban 2012; Markogiannakis, 2013; Curcio, 2014; Arizpe, 2016; Sousa, 2016d).

Alguns exemplos de β -lactamases de cada uma das quatro classes da classificação de Ambler são apresentados na seguinte Figura:

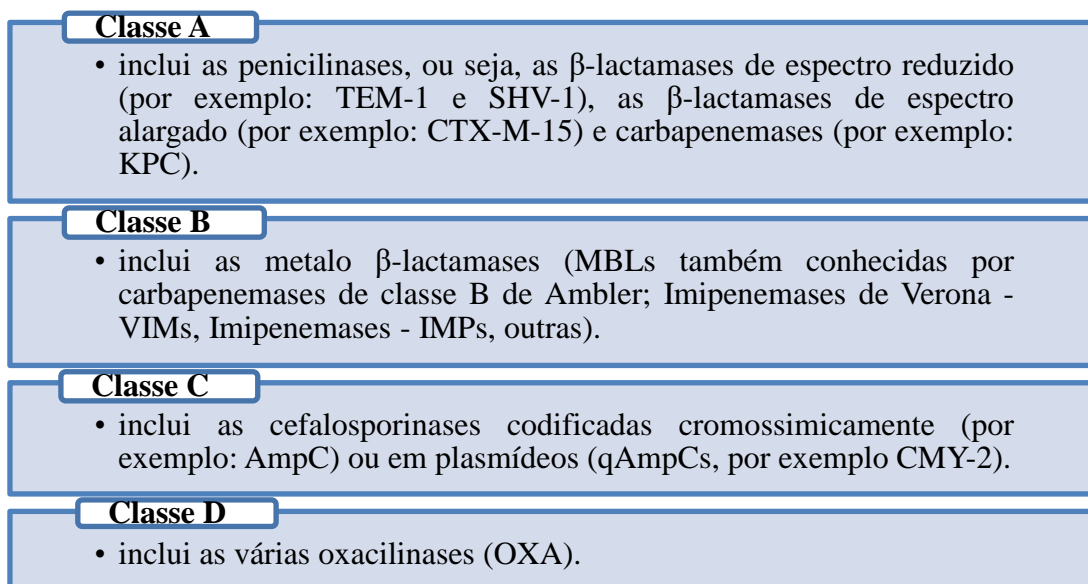


Figura 8. Exemplos de β -lactamases segundo a classificação de Ambler (adaptado de Sousa *et al*, 2016)

Atualmente nenhum antibiótico β -lactâmico, com exceção do aztreonamo, é capaz de atuar em bactérias produtoras de MBLs, e isto constitui um problema de saúde pública, pois quando surgem resistências já não há muitas alternativas dentro e fora dos β -lactâmicos devido a surgirem cada vez mais estirpes multirresistentes. Isto acontece, por exemplo, devido ao facto das MBLs se disseminarem rapidamente para outras estirpes, através de elementos genéticos móveis (plasmídeos) que albergam frequentemente muitos outros genes de resistência (Sousa *et al*, 2016b).

III. Carbapenemases

1. Diversidade

As carbapenemases representam a família mais versátil de β -lactamases, e possuem a capacidade peculiar de hidrólise da maioria dos β -lactâmicos, incluindo os mais potentes, especificamente os carbapenemos. As infeções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases são motivo de grande preocupação. Tal sucede porque este tipo de bactérias apresenta enzimas inativadoras de um amplo conjunto de antibióticos β -lactâmicos e, adicionalmente têm a capacidade de acumular mecanismos de defesa que as tornam resistentes a outras famílias de antibióticos, como aminoglicosídeos, quinolonas, entre outros.

Esta família de β -lactamases é classificada em três classes moleculares, as classes A, B e D de Ambler, apresentando diferentes perfis de hidrólise para os carbapenemos e outros β -lactâmicos, bem como diferentes perfis de inibição por inibidores de β -lactamases (Nordmann e Poirel, 2014).

A classe A de Ambler inclui: i) carbapenemases de *Klebsiella pneumoniae* (KPCs), que são clínica e epidemiologicamente as enzimas mais importantes desta classe, sendo principalmente identificadas em isolados de *K. pneumoniae*, mas também em isolados de *Enterobacteriaceae* (como por exemplo: *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii*), sendo raras em isolados de *P. aeruginosa* (Rapp e Urban, 2012; Nordmann e Poirel, 2014); ii) enzima *Serratia marcescens* (SME); iii) não metalo-carbapenemase de classe A (NMC-A) isolada pela primeira vez a partir de *Enterobacter cloacae*; iv) β -lactamases hidrolisadoras de imipenemo (IMI) identificadas em isolados de *E. cloacae*/*E. asburiae* e v) algumas variantes da família de β -lactamases de espectro alargado Guiana (GES) recuperadas de

isolados de *P. aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007; Queenan e Bush, 2007; Curcio, 2014; Nordmann e Poirel, 2014).

A classe B de Ambler inclui carbapenemases também conhecidas como MBLs, incluindo, por exemplo: i) imipenemases (IMPs) identificadas em isolados de *S. marcescens*; ii) imipenemases de Verona (VIMs) identificadas principalmente em bacilos de Gram negativo não fermentadores, como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e com menos frequência em *Enterobacteriaceae*; e iii) MBL de Nova Deli (NDM-1) identificada pela primeira vez num isolado de *K. pneumoniae*, sendo mais tarde identificada em isolados de *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae* e *Morganella morganii* (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007; Queenan e Bush, 2007; Curcio, 2014). Nesta classe de carbapenemases incluem-se ainda outras enzimas menos frequentemente descritas, tais como GIM-1, identificada em isolados de *P. aeruginosa* na Alemanha, SPM-1 em vários clones de *P. aeruginosa* no Brasil e SIM-1 a partir de isolados de *A. baumannii* na Coreia, entre outras (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007).

A classe D inclui as carbapenemases do tipo OXA, que são encontradas quase exclusivamente em *A. baumannii*, embora OXA-48 tenha sido identificada em *Enterobacteriaceae* (como por exemplo *K. pneumoniae* e *E. coli*) (Curcio, 2014).

No entanto, alguns autores como Poirel, Pitout e Nordmann (2007) identificam quatro classes de carbapenemases, ou seja, para além das classes supracitadas também incluem as cefalosporinases de classe C de Ambler na família das carbapenemases. Para tal basearam-se na β -lactamase CMY-10, uma β -lactamase AmpC mediada por plasmídeo identificada num isolado de *E. aerogens*, a qual mostrou ser uma cefalosporinase com algumas propriedades de carbapenemase (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007).

2. Propriedades enzimáticas gerais e específicas

Quanto aos perfis de hidrólise e inibição sabe-se que, todas as carbapenemases de classe A têm a capacidade para hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos, incluindo carbapenemos, cefalosporinas de estreito e largo espectro, penicilinas e monobactams (por exemplo, aztreonam) e todas são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. Sabe-se no entanto que o ácido bórico é um bom inibidor deste tipo de carbapenemases (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007).

As β -lactamases de classe B de Ambler são caracterizadas pela capacidade de hidrólise para carbapenemos e pela sua resistência à inibição pelos inibidores de β -lactamases comercialmente disponíveis. Para além dos carbapenemos, a maioria destas enzimas hidrolisa cefalosporinas e penicilinas, mas não possui capacidade de hidrólise para monobactamos como o aztreonamo (Markogiannakis, 2013). O seu mecanismo de hidrólise é dependente da interação das β -lactamases com os iões de zinco no local ativo da enzima, motivo pelo qual a sua atividade é apenas inibida pelo EDTA, quelante de iões Zn^{2+} e outros catiões divalentes, mas não pelo ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam (Curcio, 2014; Rubin e Pitout, 2014; Sousa *et al*, 2016d).

As β -lactamases de classe D de Ambler hidrolisam imipenemo e meropenemo, mas têm pouca capacidade para hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e monobactamos como o aztreonamo. A sua atividade é fracamente inibida pelo ácido clavulânico, sendo inibida pelo cloreto de sódio (NaCl) (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007; Queenan e Bush, 2007; Sousa *et al*, 2016d).

3. Principais grupos bacterianos produtores de carbapenemases

Quanto à epidemiologia das carbapenemases, no que respeita às espécies bacterianas envolvidas, sabe-se que é bastante diversificada, como se pode ver nas Figuras 9, 10 e 11. As carbapenemases de classe A têm sido maioritariamente descritas entre espécies de *Enterobacteriaceae*, principalmente o tipo KPC, mas também são encontradas em *P. aeruginosa* (sobretudo o tipo GES); as carbapenemases de classe B (metalo-carbapenemases), nomeadamente os tipos VIM, IMP e NDM, são frequentemente descritas em isolados de *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e com menos frequência em *A. baumannii*; as carbapenemases de classe D (oxacilinas) encontram-se presentes tanto em espécies de *Enterobacteriaceae* (principalmente a OXA-48), como em *A. baumannii* (OXA-51 ou OXA-23) (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007; Curcio, 2014).

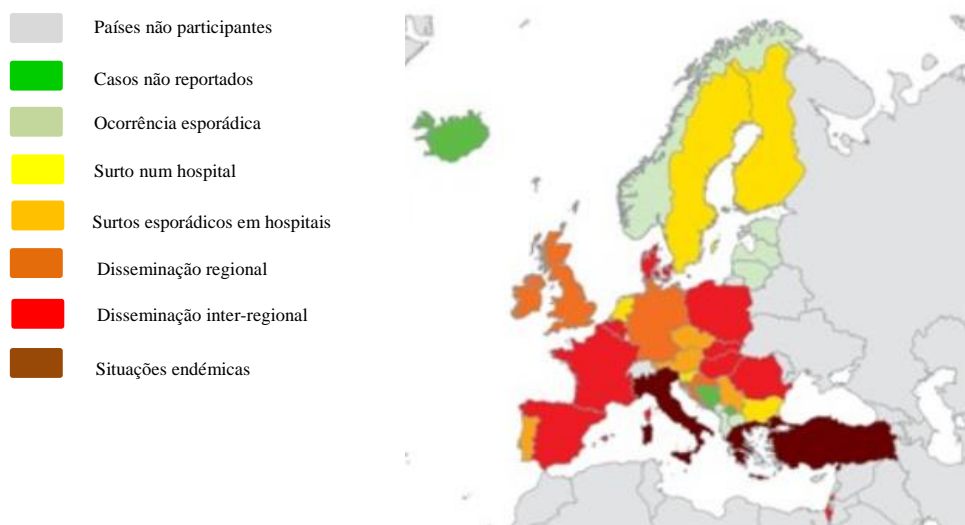


Figura 9. Epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases na Europa (adaptado de ECDC). Disponível em: <http://www.infarmed.pt>.

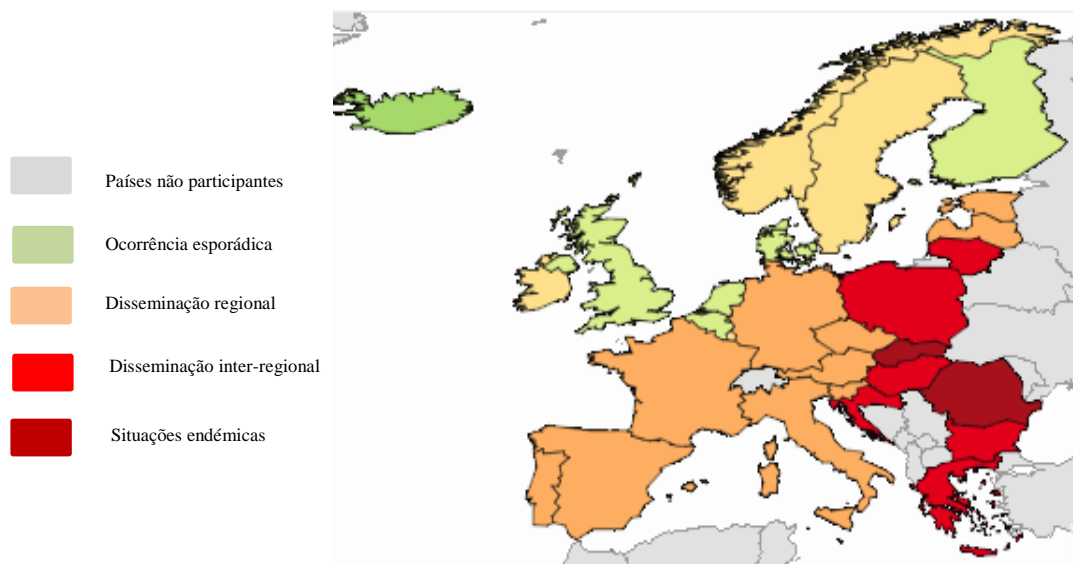


Figura 10. Epidemiologia de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemases na Europa (adaptado de ECDC, 2015). Disponível em: <http://www.infarmed.pt>.

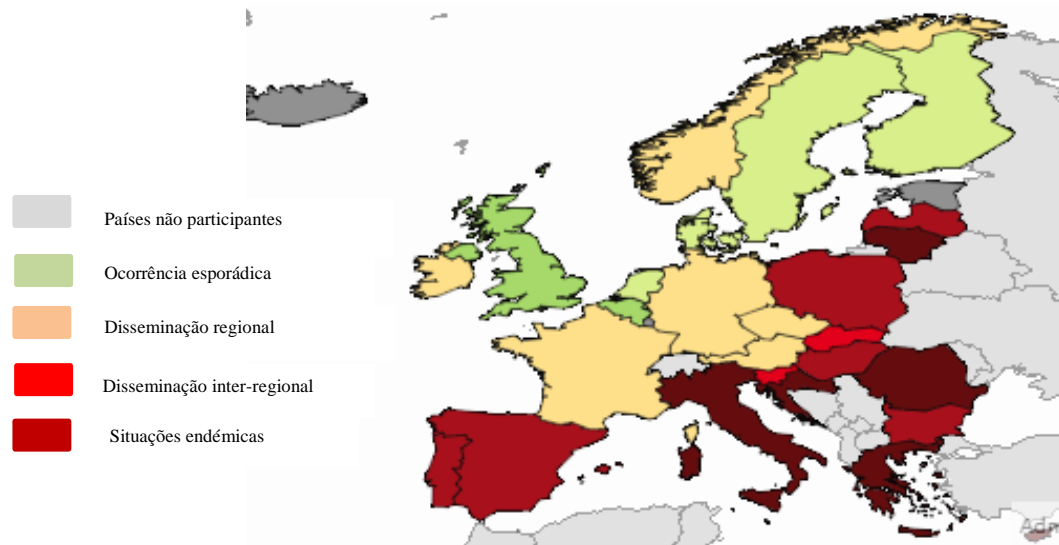


Figura 11. Epidemiologia de *Acinetobacter baumannii* produtores de carbapenemases na Europa (adaptado de ECDC, 2015). Disponível em: <http://www.infarmed.pt>.

Existem, no entanto, outros grupos bacterianos resistentes aos carbapenemos por produção de carbapenemases, embora tenham menos relevância a nível clínico.

Estas estirpes são preocupantes porque para além de produzirem carbapenemases são também resistentes a outras famílias, sendo muitas vezes estirpes produtoras de carbapenemases com características de MDR, XDR ou PDR. As bactérias produtoras de carbapenemases do tipo MDR, como por exemplo algumas estirpes de *K. pneumoniae*, são assim designadas devido à sua resistência *in vitro* a pelo menos um agente em três ou mais classes de antibióticos (Magiorakos, 2011).

Por outro lado, os organismos XDR, como alguns isolados já descritos de *A. baumannii* produtores de carbapenemases (Doi *et al*, 2009; Park *et al*, 2010), são resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos, sendo esta resistência conhecida como resistência extrema, uma vez que os isolados bacterianos permanecem suscetíveis a apenas uma ou duas categorias de antibióticos. Os organismos PDR, como algumas estirpes de *P. aeruginosa* (Wang *et al*, 2006) ou *A. baumannii* (Bonnin, Nordmann e Poirel, 2013) produtores de carbapenemases, são definidos como não suscetíveis a todos os agentes de todas as categorias de antimicrobianos testados (Magiorakos, 2011). Na literatura são cada vez mais frequentemente descritas espécies produtoras de

carbapenemases que adicionalmente exibem um fenótipo de MDR, XDR ou PDR, sendo os exemplos mais frequentes: *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Nesta época de extrema resistência, todos os países devem estar alerta para a sua detecção rápida especialmente em situações de surtos hospitalares.

Estes organismos podem ser resistentes a todos os agentes antimicrobianos disponíveis ou permanecer suscetíveis apenas a agentes potencialmente tóxicos como as polimixinas. Face ao número limitado de novos agentes antimicrobianos percebe-se que o problema do aumento da resistência antimicrobiana é bastante preocupante (Magiorakos, 2011).

3.1 Epidemiologia de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* produtores de carbapenemases

A epidemiologia das carbapenemases a nível geográfico é muito variada, sendo que a maior preocupação clínica se deve às cinco grandes carbapenemases mais disseminadas no mundo: não metalo-carbapenemases – KPC (classe A) e OXA-23/-48 (classe D) e metalo-carbapenemases – IMP, NDM e VIM (Woodford *et al*, 2013; Nordmann e Poirel, 2014; Poirel, Pitout e Nordmann, 2015).

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases do tipo KPC foram inicialmente relatadas nos Estados Unidos da América e na Grécia, disseminando-se globalmente em poucos anos por todo o mundo, estando muito associadas à grande disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos (Curcio, 2014). Estas bactérias são habitualmente associadas a infeções nosocomiais graves, incluindo infeções sistémicas, entre outras, e são codificadas por genes transportados em plasmídeos que são transferíveis entre bactérias de Gram negativo por conjugação, como *E. coli*, *Klebsiella oxytoca* e espécies de *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. e *Proteus* sp.. Na Europa, as bactérias produtoras de KPC foram encontradas principalmente em áreas endémicas, tais como, Grécia, Itália e Polónia surgindo como endémicas também nos Estados Unidos, Puerto Rico, Colombia, China e em Israel. De notar que KPC é a principal carbapenemase nos Estados Unidos da América e em Portugal (Woodford *et al*, 2013 e Nordmann e Poirel, 2014; Rubin e Pitout, 2014; Doi e Paterson, 2015; Poirel, Pitout e Nordmann, 2015).

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases do tipo OXA (OXA-48 e suas variantes) foram identificadas pela primeira vez num isolado de *K. pneumoniae*, em 2003 na Turquia. O gene OXA-48 geralmente é codificado num plasmídeo e pode atingir outras espécies de *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, mas a maioria dos casos foi relatada em *K. pneumoniae*. Os isolados produtores de OXA-48 apresentam uma ampla disseminação em todos os países europeus, como Espanha, Bélgica, entre outros, e pensa-se que para além da Turquia um dos seus principais reservatórios sejam países do norte de África, surgindo mais recentemente na região do Golfo e na Índia (Nordmann e Poirel, 2014, Doi e Paterson, 2015).

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases do tipo VIM são endémicas na Grécia e têm sido descritas em vários surtos a nível mundial, como Brasil, Espanha, Itália (prevalentes na parte sul da Europa), entre outros. Enquanto *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases do tipo IMP têm sido relatadas com maior prevalência no Japão, China (continente asiático) e Austrália (Poirel, Pitout e Nordmann, 2007; Curcio, 2014; Nordmann e Poirel, 2014; Poirel, Pitout e Nordmann, 2015).

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases do tipo NDM (como por exemplo *E. coli*) apresentam como reservatório primário o subcontinente indiano e como reservatórios secundários o Paquistão, as Balcãs e a região do Golfo. Tendo sido também identificadas em França e Marrocos (Nordmann, 2014; Doi e Paterson, 2015).

Em *P. aeruginosa* a ocorrência de carbapenemases de classe A é esporádica, sendo entre elas apenas detetadas, GES-2 (surto no sul de África em 2000), GES-5, KPC-2 (Colômbia) e KPC-5 (Porto Rico) (Zhao e Hu, 2010). As carbapenemases do tipo KPC nos casos referidos são plasmídicas, estando por isso associadas a elementos genéticos móveis. Devido à capacidade de *K. pneumoniae* como vetor de disseminação de determinantes de resistência, chegaram a ser as carbapenemases mais expandidas desta classe (Nicolau e Oliver, 2010).

A maioria das carbapenemases de classe B (IMP e VIM) podem ser detetadas em *P. aeruginosa* onde geralmente são codificadas por estruturas genéticas móveis. Sabe-se também que a maioria dos seus genes foram descobertos nesta espécie. A primeira descoberta de IMP-1transferível foi num isolado de *P. aeruginosa* em 1988 no Japão, existindo atualmente 26 tipos de IMP, dos quais 18 foram identificados em *P.*

aeruginosa (Zhao e Hu, 2010). *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases do tipo VIM têm sido descritas principalmente na Europa e do tipo IMP na Ásia.

As carbapenemases de classe D são raramente encontradas em *P. aeruginosa*, sendo, por exemplo, OXA-40, a única carbapenemase transferível desta classe detetada em isolados clínicos em Espanha (Nicolau e Oliver, 2010).

Os isolados de *A. baumannii* produtores de NDM-1 foram identificados na China e Índia, demonstrando resistência elevada a todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenemos - imipenemo e meropenemo. Variantes de IMP também foram encontradas em *A. baumannii*: IMP-1 foi identificada em isolados na Itália, Japão e Coreia do Sul; IMP-2 na Itália e Japão; IMP-4 em Hong Kong; IMP-5 em Portugal; IMP-6 no Brasil; e IMP-11 no Japão. As carbapenemases do tipo VIM foram raramente identificadas em *A. baumannii*, havendo um relato de VIM-2 na Coreia do Sul. SIM-1 também é um tipo de carbapenemase adquirida encontrada em *A. baumannii*, tendo sido descrita em isolados da Coreia do Sul (Poirel e Nordmann, 2006).

Isolados de *A. baumannii* produtores de carbapenemases do tipo KPC foram identificados em Porto Rico.

Em relação às carbapenemases de classe D encontradas em *A. baumannii*, OXA-23 é a mais difundida em todo o mundo, tendo sido identificada na Roménia, no Brasil, na Coreia do Sul e na Polinésia Francesa. No entanto, Bonnin *et al.* descreveram em 2013 a existência de *A. baumannii* produtores de OXA-24/-40 prevalentes nos EUA, Espanha e Portugal.

Isolados de *A. baumannii* produtores de OXA-27 foram identificados em Singapura; OXA-49 foi identificado em isolados de *A. baumannii* na China; OXA-40 em isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenemos recuperados em França de um paciente português, mostrando mais tarde tratar-se de uma carbapenemase disseminada em Espanha e em Portugal. OXA-58 foi identificada em isolados clínicos de *A. baumannii* de diversas origens geográficas, incluindo Espanha, Turquia, Roménia Grécia, Áustria, Reino Unido, Argentina, Kuwait e Itália (Poirel e Nordmann, 2006).

4. Impacto clínico e novas opções terapêuticas para *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* produtores de carbapenemases

O aumento da incidência da colonização e infeção por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemos (ERC) nas unidades de saúde de todos os Estados-Membros da UE tem vindo a preocupar os profissionais de saúde que delas fazem parte. Trata-se portanto de uma ameaça significativa que se deve ao facto das infeções de ERC estarem associadas a alta mortalidade, principalmente devido a atrasos na administração de tratamento efetivo e à disponibilidade limitada de opções de tratamento efetivas (Paiva, J. *et al*, 2014; Giske, C., 2017). Em Portugal, por exemplo, apesar da existência de manuais de boas práticas, diversa literatura e recomendações europeias de fácil acesso, continuam a existir várias instituições nas quais as boas práticas não são cumpridas. O agravamento desta situação é também devido à inconsciência da gravidade do problema.

A situação de Portugal em relação a ERC nos últimos anos ainda assim não se equipara com a situação preocupante de alguns países do sul e leste da Europa, no entanto, tem-se vindo a assistir a um aumento significativo da incidência destas bactérias devido à ocorrência de alguns surtos hospitalares (Paiva, J. *et al*, 2014; ECDC, 2016). Assim sendo, para prevenção da transmissão de ERC e de outros microrganismos (transmissão cruzada) devem ser adotadas e implementadas de forma eficaz, e o mais breve possível, precauções básicas de prevenção e controlo de infeção, principalmente a higienização das mãos para todos os funcionários e visitantes que entram e saem da sala do paciente e a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados. Sendo também importante, principalmente no caso de ERC que se transmite por contacto, seguir todas as boas práticas no âmbito da higienização ambiental (com desinfeção vaporizada de peróxido de hidrogénio do meio ambiente), gestão de alimentos, roupas, resíduos e equipamentos (como por exemplo ventiladores), bem como precauções de isolamento baseadas na via de transmissão, como por exemplo quartos individuais e de isolamento. Na admissão de doentes para internamento deveria sempre ser feita uma avaliação de risco de colonização ou infeção por microrganismos resistentes a antibióticos e relevantes a nível clínico e epidemiológico. Para tal pode-se recorrer a uma zaragatoa rectal para ver se os pacientes que vão ser internados têm algumas das bactérias que têm vindo a ser abordadas neste trabalho. Caso se trate de um

indivíduo de alto risco, este deve ser isolado preventivamente e com precauções de contacto enquanto permanece internado (ECDC, 2011 e 2016; Savard e Perl, 2014).

As estirpes produtoras de KPC parecem apresentar elevada transmissibilidade, o que veio limitar as opções terapêuticas para tratar infeções causadas por estes microrganismos, conferindo resistência não só aos carbapenemos, mas também à maioria dos β -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de espectro alargado.

Em Portugal, segundo dados de 2015 do ECDC, a resistência de *K. pneumoniae* aos carbapenemos foi de 3,4%. Trata-se de uma resistência particularmente preocupante, uma vez que os carbapenemos pertencem à família de antibióticos de mais largo espectro. Estes microrganismos normalmente colonizam o trato gastrointestinal. Como possíveis opções de tratamento de infeções causadas por organismos produtores de KPC e de outras carbapenemases restam apenas a tigeciclina, as polimixinas [por exemplo: colistina (polimixina E) e polimixina B] e os aminoglicosídeos (por exemplo: gentamicina, neomicina, tobramicina) (Rapp *et al* 2012 e Sousa, 2016e).

O controlo de infeções por *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos com estes em monoterapia, já não está a ser suficiente para controlar infeções. No entanto, novas abordagens terapêuticas estão a ser estudadas, como por exemplo a associação de dois carbapenemos para tratar *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos. Como exemplo disto, existe um relato de infeção por *K. pneumoniae* tratada com associação de dois carbapenemos, ertapenemo que tem afinidade para KPCs e servirá para proteger o segundo carbapenemo (meropenemo ou doripenemo), permitindo que este se ligue às PBPs. É uma alternativa interessante, mas serão necessários ensaios clínicos controlados para determinar se só existe esta combinação e se o sucesso desta associação se deve por exemplo a um efeito único da combinação, ou se é devido à maior quantidade de carbapenemos administrada (Doi *et al*, 2015).

As espécies de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* multirresistentes são selecionadas pelo uso de antibióticos (especialmente o uso de fluoroquinolonas), podendo ser transmitidas de pessoa para pessoa através, por exemplo, das mãos dos profissionais de saúde ou por meio de contaminação ambiental.

P. aeruginosa contribui para 11% de todas as infeções nosocomiais, que resultam em altas taxas de mortalidade e morbidade, apresentando, segundo dados do

ECDC, uma percentagem de resistência aos carbapenemos de 19,8% em Portugal (ECDC, 2015). Trata-se de um organismo não fermentador que causa infeções especialmente entre imunocomprometidos, que tem como principal local de colonização o trato respiratório superior (Nicolau, 2010; Zhao, 2010).

Com o aumento da taxa de resistência de *P. aeruginosa* a carbapenemos foi necessário procurar novas opções de tratamento para infeções provocadas por estas bactérias. Para tal tem-se recorrido à colistina, antibiótico anfipático cíclico, que embora exiba nefrotoxicidade e neurotoxicidade, é a última opção para o tratamento contra estirpes MDR produtoras de carbapenemases de *P. aeruginosa*. Recorreu-se também a vários estudos *in vitro* e alguns ensaios clínicos para identificar possíveis combinações de antibióticos para tratar infeções causadas por *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases, dos quais resultaram algumas combinações, como por exemplo, cefepime e amicacina; polimixina B com carbapenemos, aminoglicosídeos ou quinolonas (Chatterjee *et al*, 2016). A tigeciclina aqui não é uma boa opção porque *P. aeruginosa* possui bombas de efluxo que expulsam a tigeciclina para fora da célula bacteriana (Dean *et al*, 2002).

Segundo Chatterjee *et al* estão a ser desenvolvidas terapias não antibióticas para tratar infeções causadas por *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases, que têm por base a utilização de probióticos e fagos. Estas pesquisas serão abordadas com algum detalhe mais adiante, sendo importante referir que alguns destes agentes terapêuticos não antibióticos, isolados ou em associação com antibióticos, são bastante eficazes contra estirpes de *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases resistentes a múltiplos fármacos.

Lactobacillus spp. constitui um exemplo de probióticos usados nestes estudos. Trata-se de bactérias intestinais bem estudadas usadas para inibir o crescimento de organismos patogénicos entéricos, como *E. coli*, *Salmonella* Typhi e *Shigella* spp., e que estão a ser estudadas para prevenir infeções em queimaduras e feridas. Chatterjee *et al* refere também a existência de estudos onde foram avaliadas as capacidades do probiótico *Lactobacillus plantarum* na inibição da patogenicidade de *P. aeruginosa*, por inibição da elastase e da formação de biofilmes.

A utilização de fagos contra *P. aeruginosa* apresenta um interesse significativo, estando a principal vantagem desta terapia relacionada com a sua atividade bactericida contra estirpes MDR produtoras de carbapenemases de *P. aeruginosa*. No entanto, esta terapia apresenta outras vantagens, como elevada eficácia em relação aos antibióticos contra biofilmes de *P. aeruginosa*. Tal sucede, porque estes biofilmes que se encontram por norma em catéteres e nas vias aéreas do paciente com fibrose cística são extremamente resistentes aos antibióticos. Nesta terapia, a ação dos bacteriófagos consiste em infetar a bactéria na superfície do biofilme, sendo que depois se replicam para gerar uma maior concentração de fago no local da infeção. Para além disto, os bacteriófagos produzem alginase, uma enzima que despolimeriza a cápsula do ácido algínico da matriz do biofilme de *P. aeruginosa* e perturba assim o crescimento destas bactérias em biofilmes (Chatterjee *et al*, 2016).

Os fagos apresentam outra grande vantagem: para além do supracitado, podem ser geneticamente modificados e desta forma reduzir as respostas inflamatórias do hospedeiro durante o tratamento. Já em ensaios clínicos de fase I, a terapia com fagos demonstra ser segura para utilização em humanos, e ensaios de fase II demonstra eficácia clínica no tratamento de otites crónicas causadas por *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases resistentes aos antibióticos em pacientes diabéticos.

Atualmente, *A. baumannii* é, sem dúvida, um dos agentes patogénicos responsáveis pelas infeções nosocomiais adquiridas no hospital. A sua transmissão ocorre por contacto direto com o paciente e com o ambiente que o rodeia, sendo que existem estudos que revelam a necessidade de medidas de precaução de contacto (principalmente relacionadas com a contaminação de luvas e roupas dos cuidadores). Estas são essenciais para prevenir que estas bactérias sejam transmitidas para outros pacientes pelos profissionais de saúde (Doi *et al*, 2015).

Devido à prevalência de infeções e surtos causados por *A. baumannii* produtoras de carbapenemases resistentes a múltiplos fármacos, poucos antibióticos são eficazes para o tratamento de infeções causadas por esta bactéria (Abbott *et al*, 2013; Lee *et al*, 2017). Os carbapenemos (principalmente, imipenemo, meropenemo e doripenemo) foram considerados antibióticos eficazes para tratar infeções por *A. baumannii*, no entanto, os clínicos foram obrigados a pesquisar novas alternativas, devido à diminuição da susceptibilidade de *A. baumannii* aos carbapenemos. As estirpes de *A. baumannii*

resistentes aos carbapenemos são também muitas vezes resistentes a quase todos (ou mesmo todos) os outros antibióticos, permanecendo susceptíveis apenas a alguns antibióticos, como por exemplo minociclina, tigeciclina e polimixinas (colistina e polimixina B) (Abbott *et al*, 2013; Lee *et al*, 2017).

A minociclina, tetraciclina de amplo espectro, é uma excelente opção para o tratamento de infecções por *A. baumannii*, uma vez que esta bactéria apresenta uma elevada taxa de susceptibilidade em todo o mundo (cerca de 80%). Segundo Lee *et al* a taxa de resistência à minociclina (cerca de 20%) pode ser facilmente resolvida se esta for associada à colistina, sendo esta a polimixina que melhor funciona em infecções por *A. baumannii*. No entanto, têm surgido estirpes de *A. baumannii* resistentes à colistina em todo o mundo, o que limita ainda mais as opções de tratamento destas infecções (Lee *et al*, 2017).

Aponta-se como possível alternativa terapêutica a colistina, a polimixina B, não em monoterapia devido à nefrotoxicidade, mas em combinação com carbapenemos e tigeciclina (Abbott *et al*, 2013; Lee *et al*, 2017). Estudos recentes para encontrar uma alternativa aos carbapenemos e à colistina vão surgindo. Um deles revela que análogos de endolisinas, enzimas líticas que degradam o peptidoglicano das bactérias, são uma classe promissora de agentes antimicrobianos devido ao seu modo de ação. Ou seja, embora o seu mecanismo de ação seja semelhante ao dos β -lactâmicos, como estas enzimas degradam diretamente o peptidoglicano, em vez das enzimas que participam na sua síntese, a possibilidade do surgimento de um mecanismo de resistência é baixa (Lee *et al*, 2017).

Como medidas de base para prevenção da transmissão de *A. baumannii* resistente a carbapenemos em hospitais e outros locais de saúde, enumeram-se o reforço da limpeza do meio ambiente/superfícies que rodeiam os pacientes, de dispositivos médicos, capacidade adequada de laboratórios de microbiologia (incluindo deteção rápida de bactérias produtoras de carbapenemases e apoio no controlo de surtos pelas mesmas), e capacidade suficiente de instalações de saúde para isolamento de contacto (ECDC, 2016b). No entanto as evidências apontam que a medida mais eficaz é a higienização das mãos, podendo ser realizada com sabão antisséptico (clorexidina a 2%) antes e após o cuidado dos pacientes. Estas medidas fundamentam-se na possibilidade

que existe de microrganismos resistentes permanecerem nas mãos, objetos inanimados, superfícies/ambientes e de serem transmitidas de um paciente para outro.

Em relação ao papel do laboratório de microbiologia na execução de testes laboratoriais de confirmação de bactérias produtoras de carbapenemases, sabe-se que existem várias abordagens, podendo ser utilizados métodos moleculares ou não-moleculares. Nos laboratórios de microbiologia clínica, os métodos não-moleculares são mais viáveis porque não requerem instrumentos e reagentes caros. O mais amplamente usado era o teste Hodge modificado, no entanto, este teste apresenta frequentemente falsos positivos e deteta apenas carbapenemases em geral. Foi desenvolvido mais recentemente um teste cromogénico rápido, chamado "Carba NP" (Doi e Paterson, 2015), onde a hidrólise do imipenemo por carbapenemase bruta extraída dos isolados é observada por alterações de cor num poço de microtitulação. Um outro similar é o "Blue-Carba" (Pires *et al*, 2013). Estes testes possuem sensibilidade equivalente e especificidade superior em comparação com o teste de Hodge modificado, e têm a vantagem adicional de não precisar de um dia extra de cultura para leitura dos resultados.

Face a isto, e devido ao facto de nos últimos anos os isolados bacterianos produtores de carbapenemases se terem disseminado globalmente, tem vindo a surgir uma preocupação cada vez maior face às elevadas taxas de morbilidade e mortalidade associadas. Em suma, trata-se de microrganismos associados a infeções nosocomiais graves, associadas a elevada mortalidade e de difícil tratamento, sendo muito escassas as opções terapêuticas eficazes (Oteo e Aracil, 2015).

Conclusão

A crescente taxa de resistência aos antibióticos em bacilos de Gram negativo, associada ao decréscimo da síntese e desenvolvimento de novas classes de antibióticos, leva a que os agentes terapêuticos atualmente usados estejam em risco de perda de eficácia, sem que existam alternativas para o tratamento de diversas infecções. Há uma associação entre o elevado consumo de uma classe de antibióticos e o maior desenvolvimento de resistência a essa classe. Assim sendo, a elevada taxa de resistência aos antibióticos leva à opção por esquemas de terapêutica antibiótica de mais largo espectro, de forma a minimizar insucessos terapêuticos, aumentando, no entanto, a pressão antibiótica e a probabilidade de desenvolvimento de resistências.

Na última década, o interesse clínico pelas polimixinas (por exemplo, colistina) aumentou devido a dois fatores: surgimento de bactérias de Gram negativo resistentes a carbapenemos, cefalosporinas e aminoglicosídeos; e a dificuldade em encontrar novas moléculas antibióticas eficazes. As polimixinas permanecem ativas contra a maioria desses isolados multirresistentes, no entanto, a emergência da resistência à colistina decorrente do aumento do seu uso é preocupante, uma vez que, em muitos casos, as polimixinas são a última opção terapêutica (Potron et al, 2015).

Mais do que uma ameaça, o aumento das taxas de resistência aos antibióticos em diversos microrganismos e o aumento das taxas de incidência de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases são uma realidade muito atual. Assim sendo, cabe às unidades de saúde consciencializar-se da gravidade da situação e persistir na pesquisa de respostas eficazes, tendo presente que o paciente deve ser sempre protegido o máximo possível.

A emergência e disseminação da resistência a antibióticos deve ser reduzida. Tal é possível com a promoção de um uso racional destes fármacos, não os utilizando quando não são necessários, e com a utilização (quando estritamente indicados) de antibióticos de espectro o mais estreito possível, escolhidos se possível com base em dados de antibiograma, e apenas durante o tempo necessário.

Bibliografia

Abbott, I. *et al* (2013). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11 (4), pp. 395-409

Arizpe, A. *et al* (2016). Updates in the management of cephalosporin-resistant gram-negative bacteria. *Current Infectious Disease Reports*, 18 (12)

Ashkenazi, S. (2013). Beginning and possibly the end of the antibiotic era: the antibiotic era. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 40 (3), pp. E179-E182

Bonnin, R. A., Nordmann, P. e Poirel, L. (2013). Screening and deciphering antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*: a state of the art. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11 (6), pp. 571-583

Breilh, D. *et al* (2013). Carbapenems. *Journal of Chemotherapy*, 25 (1), pp. 1-17

Bush, K. e Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (3), pp. 969-976

Bush, K., Jacoby, G. A. e Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, pp. 1211-1233

Chatterjee *et al* (2016). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology*, 306 (1), pp. 48-58

Ceccarelli, D. *et al* (2016). Chromosome-based *bla*_{OXA-48}-like variants in *Shewanella* species isolates from food-producing animals, fish, and the aquatic environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61 (2), pp. AAC.01013-16

Curcio, D. (2014). Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections: are you ready for the challenge?. *Current Clinical Pharmacology*, 9, pp. 27-38

Davies, J. e Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotics resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, pp. 417-433

Dean, C. R. *et al* (2003). Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (3), pp. 972-978

Doi, Y. *et al* (2009). Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (6), pp. 980-982

Doi, Y. e Paterson, D. L. (2015). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36 (1), pp. 74-84

Doi, Y., Murray, G. L. e Peleg, A. Y. (2015). *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance - treatment options. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 36 (1), pp 85-98

ECDC (2011). Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. [Em linha]. Disponível em <<https://ecdc.europa.eu>> [Consultado em 21/09/2017]

ECDC (2015). Surveillance atlas of infectious diseases: antimicrobial resistance. [Em linha]. Disponível em <<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>> [Consultado em 07/07/2017]

ECDC (2016a). Rapid risk assessment: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. [Em linha]. Disponível em <<https://ecdc.europa.eu>> [Consultado em 21/09/2017]

ECDC (2016b). Rapid risk assessment: carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings. [Em linha]. Disponível em <<https://ecdc.europa.eu>> [Consultado em 22/09/2017]

Fernández, L. e Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25 (4), pp. 661-681

INFARMED (2016a). Antibióticos-resistência. [Em linha]. Disponível em <<http://www.infarmed.pt>> [Consultado em 02/02/2017]

INFARMED (2016b). Utilização de antibióticos em Portugal e na Europa. [Em linha]. Disponível em <<http://www.infarmed.pt>> [Consultado em 07/07/2017]

- Lee, C. *et al* (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, pp 1-35
- Ligon, B. L. (2004). Sir Alexander Fleming: scottish researcher who discovered penicillin. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(1), pp. 58-64
- Loureiro, R. J. *et al* (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 34, pp. 77-84
- Ly, R. *et al* (2017). Characterization of a novel class A carbapenemase PAD-1 from *Paramesorhizobium desertii* A-3-ET, a strain highly resistant to β -lactam antibiotics. *Scientific Reports*, 7 (1), pp. 1-9
- Magiorakos, A. P. *et al* (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (3), pp. 268-281
- Markogiannakis, A. *et al* (2013). Confronting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 8 (5), pp. 1147 – 1161
- Nicolau, C. e Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, pp. 19-28
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), pp. 593-656
- Nordmann, P. (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44 (2), pp. 51-56
- Nordmann, P. e Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 20, pp. 821-830
- Oteo, J. e Aracil, M. (2015). Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro

extendido y carbapenemasas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33, pp. 27-33

Paiva, J. A *et al* (2014). Programa de prevenção e controlo de infeções e de resistência aos antimicrobianos. *Direção-Geral da Saúde*.

Park, Y. S. *et al* (2010). Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors for acquisition and prevalent OXA-type carbapenemases - a multicentre study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36 (5), pp. 430-435

Pires, J., Novais, A. e Peixe, L. (2013). Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (12), pp. 4281-4283

Pitout, J., Nordmann, P. e Poirel, L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59 (10), pp. 5873–5884

Poirel, L. e Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12, pp. 826-836

Poirel, L., Pitout, J. e Nordmann, P. (2007). Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiology*, 2 (5), pp. 501-512

Potron, A., Poirel, L. e Nordmann, P. (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45 (6), pp. 568–585

Queenan, A. M. e Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (3), pp. 440-458

Ramos, M. H. S. S. (2010). Resistência em bactérias de Gram-negativo. *In Cadernos de Saúde*, 3, pp. 93-99.

Rapp, R. P. e Urban, C. (2012). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: history, evolution and microbiology concerns. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 32 (5), pp. 399-407

- Savard, P. e Perl, T. M. (2014). Combating the spread of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a battle that infection prevention should not lose. *Clinical Microbiology and Infection*, 20 (9), pp. 854-861
- Shalini, A. *et al* (2017). First report of bla OXA-181 -mediated carbapenem resistance in *Aeromonas caviae* in association with pKP3-A: threat for rapid dissemination. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, pp. 310-314
- Sousa, J. C. (2001). *Antibióticos antibacterianos*. 1ª edição Porto, Associação Nacional de Farmácias
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de antibióticos antibacterianos*. 2ª edição Porto, Fundação Fernando Pessoa
- Sousa, J. C. *et al* (2016a). Dados históricos sobre antibioterapia. *In Antibióticos*. 1ª Edição Porto, Edições Fernando Pessoa, pp. 24-35
- Sousa, J. C. *et al* (2016b). Principais grupos de antibióticos antiparietais. *In Antibióticos*. 1ª Edição Porto, Edições Fernando Pessoa, pp. 85-91
- Sousa, J. C. *et al* (2016c). Antibióticos inibidores da síntese do peptidoglicano na fase parietal. *In Antibióticos*. 1ª edição Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 129-156
- Sousa, J. C. *et al* (2016d). Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos. *In Antibióticos*. 1ª edição Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 165-189
- Sousa, J. C. *et al* (2016e). Monografias. *In Antibióticos*. 1ª edição Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp. 301-310
- Suárez, C. e Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactâmicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (2), pp. 116-129
- Wang, C. Y. *et al* (2006). Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clinical Microbiology and Infection*, 12 (1), pp. 63-68

Woodford, N. *et al* (2013). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making?. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 69, pp. 287-291

Zhao, W. e Hu, Z. (2010). β -lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology*, 36 (3), pp. 245-258