

Rute Andreia Pereira Ferreira

Resistência de *Enterobacteriaceae* a Antibióticos Beta-Lactâmicos



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Rute Andreia Pereira Ferreira

Resistência de *Enterobacteriaceae* a Antibióticos Beta-Lactâmicos



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2015

Rute Andreia Pereira Ferreira

Resistência de *Enterobacteriaceae* a Antibióticos Beta-Lactâmicos

Atesto a originalidade do trabalho,

Ass: _____

(Rute Andreia Pereira Ferreira)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação
do Professor Doutor João Carlos de Sousa.

Resumo

A resistência aos antibióticos por estirpes de bactérias multirresistentes tem aumentado drasticamente.

A família *Enterobacteriaceae* é a responsável pela maior parte das infecções tanto a nível hospitalar como na comunidade, onde os géneros *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. são os de maior relevância para o Homem.

Os antibióticos β -lactâmicos representam a classe de eleição no tratamento de infeções causadas por estas bactérias, atuando na fase parietal da síntese do peptidoglicano levando à lise celular.

A produção de β -lactamases (ESBLs, β -lactamases do tipo AmpC e carbapenemases) representa o mecanismo de resistência de maior prevalência no combate a infeções causadas por este tipo de microrganismos, uma vez que inativa a ação dos antibióticos β -lactâmicos por hidrólise do anel β -lactâmico.

Os inibidores das β -lactamases têm sido utilizados como alternativa à resistência bacteriana por produção de β -lactamases, com o desenvolvimento de moléculas cada vez mais inovadoras.

O uso incorreto e excessivo de antibióticos pela população é um fator que conduz igualmente ao surgimento de bactérias multirresistentes, devido à pressão seletiva exercida sobre as bactérias. Na realidade as estirpes que exibem este tipo de resistências acumulam genes de resistências aos outros grupos de antibióticos, sendo diminutas as opções terapêuticas.

A morbidade e a mortalidade associadas a infeções por bactérias multirresistentes, bem como o impacto negativo quer nos doentes, quer na sociedade e na economia, fazem com que o problema da multirresistência a antibióticos seja apontado como um enorme desafio para a Saúde Pública Mundial.

Existe portanto, uma necessidade eminente de se adotarem medidas de controlo da prescrição, consumo e utilização de antibióticos pela população, sobretudo na área hospitalar.

Torna-se urgente fazer o despiste dos doentes portadores de estirpes produtoras destas resistências no ato do internamento hospitalar e o seu isolamento, a fim de dificultar a disseminação dessas resistências. Para atingir este desiderato os laboratórios hospitalares devem utilizar técnicas expeditas para a detecção das estirpes bacterianas MDR, utilizando técnicas convencionais e de biologia molecular.

Palavras-chave: “*Enterobacteriaceae*”; “resistência a antibióticos”; “antibióticos β -lactâmicos”; “ESBLs” “multirresistência”.

Abstract

The antibiotic resistance by strains of multiresistant bacteria has increased dramatically.

The *Enterobacteriaceae* family is responsible for most infections both in hospital and in the community where *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. are the most relevant to humans.

The β -lactam antibiotics are the most chosen in the treatment of infections caused by these bacteria, acting in the parietal layer of peptidoglycan synthesis leading to cell lysis.

The production of β -lactamases (ESBLs, β -lactamase AmpC type and carbapenemases) is the most prevalent resistance mechanism to combat infections caused by such microorganisms since that inactivates the action of β -lactams by hydrolysis of the β -lactam ring.

Inhibitors of β -lactamases have been used as alternative to bacterial resistance to β -lactamases production with the development of increasingly innovative molecules.

Incorrect and overuse of antibiotics by the population is a factor that also leads to the emergence of multi-resistant bacteria, due to selective pressure on bacteria. The strains that exhibit such resistance genes accumulate resistance to other groups of antibiotics, being the therapeutic options diminished.

The morbidity and mortality associated with infections by multidrug-resistant bacteria as well as the negative impact either in patients or in the society and the economy, make the problem of multidrug resistance to antibiotics is a huge challenge for the World Public Health.

There is an urgent need to adopt measures to control prescription, consumption and use of antibiotics by the population, especially in the hospital area.

It is urgent to identify the holders producing these resistances in the hospital and isolate them in order to hinder the spread of these resistances. To achieve this goal hospital laboratories must use efficient techniques for detection of MDR bacterial strains, using standard techniques of molecular biology.

Keywords

"*Enterobacteriaceae*"; "Antibiotic resistance"; "β-lactam antibiotic"; "ESBLs"
"multidrug resistance".

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que ao longo deste percurso me ajudaram de alguma forma e me fizeram acreditar que era possível e que eu era capaz.

Dedico em especial aos meus pais, à minha irmã e à minha avó que sempre estiveram lá para me apoiar em todas as adversidades e me elogiaram e compartilharam comigo a felicidade nos momentos felizes e nas conquistas.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional, à minha avó que esteve sempre presente e disposta a ouvir-me e a dar-me os melhores conselhos, à minha irmã porque é uma das pessoas mais importantes da minha vida.

Agradeço ao meu namorado, que sempre me apoiou e me deu coragem para continuar em frente.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor João Carlos de Sousa, por todo o apoio, dedicação, toda a experiência transmitida e partilhada e pela incrível paciência.

Agradeço a todos os meus amigos, colegas de curso, professores e funcionários de Universidade Fernando Pessoa pela convivência e aprendizagem.

Muito obrigada a todos!

Índice

Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas	V
Abreviaturas	VI
I Introdução	1
1.1 A Família <i>Enterobacteriaceae</i>	2
1.2 Antibióticos β -lactâmicos	5
1.2.1 Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos	8
II Resistência a antibióticos β -lactâmicos e seus mecanismos	10
2.1 Modificação dos alvos (PBPs)	12
2.2 Bombas de efluxo	12
2.3 Impermeabilização da membrana externa.....	12
2.4 Hidrólise enzimática dos β -lactâmicos por β -lactamases	13
III β -lactamases.....	15
3.1 Classificação das β -lactamases.....	15
3.2 Inibidores das β -lactamases.....	17
3.3 β -lactamases de largo espectro (ESBLs)	19
3.4 Detecção laboratorial de ESBLs	21
IV β -lactamases do tipo AmpC	24
V Carbapanemases	24
5.1 KPC	28
VI Epidemiologia de <i>Enterobacteriaceae</i> e produtoras de ESBLs	29
VII Mecanismos de disseminação de genes de resistência em <i>Enterobacteriaceae</i>	30
7.1 Dispersão clonal	31
7.2 Transferência horizontal de genes	31

7.2.1 Plasmídeos	32
7.2.2 Integções	33
7.2.3 Transposões e Sequências de inserção	33
VIII Realidade atual e perspectivas futuras da problemática da resistência aos antibióticos.....	34
IX Conclusão	36
X Bibliografia	38

Índice de Figuras

Figura 1. Fermentação da glucose em meio de cultura Kligler Iron Agar (Oxoid). A cor amarela no fundo da gelose inclinada indica que a bactéria utiliza fermentativamente a glucose (imagem cedida por J. C. Sousa).....	2
Figura 2. Estrutura ultramicroscópica de <i>E. coli</i> (negative staining), sendo visível os flagelos (F) (imagem cedida por J. C. Sousa).....	3
Figura 3. A família <i>Enterobacteriaceae</i> (adaptado de Faculty.irsc.edu).....	3
Figura 4. Disseminação de estirpes MDR em diferentes nichos e consequente transmissão ao Homem (adaptado de CDC, 2013).....	4
Figura 5. Alexander Fleming e a descoberta do fungo produtor da Penicilina (retirado de http://www.infoescola.com/farmacologia/penicilina/).....	5
Figura 6. Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (adaptado de http://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-of-beta-lactam-antibiotics/).....	7
Figura 7. Interação β -lactâmico/transpeptidase (ENZ), formando-se um composto inativo peniciloilenzima (adaptado de Sousa, 2006).....	8
Figura 8. Analogia estrutural entre penicilina e D-alanil-D-alanina (adaptado de Sousa, 2006).....	9
Figura 9. Autólise da célula bacteriana induzida pela Penicilina (adaptado de Sousa, 2006).....	10
Figura 10. Estrutura da parede celular de bactérias de Gram negativo e mecanismos de resistência dos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Llarrull <i>et al.</i> , 2010).....	11
Figura 11. Inativação da penicilina G mediada por penicilinases (adaptado de Guimarães <i>et al.</i> , 2010).....	13

Figura 12. Mecanismo de inativação de antibióticos com β -lactamases com serina no centro ativo (adaptado de Wang <i>et al.</i> , 1999).....	14
Figura 13. Mecanismo de hidrólise de um β -lactâmico por uma metalo- β -lactamase (adaptado de Wang <i>et al.</i> , 1999).....	14
Figura 14. Estrutura dos inibidores das β -lactamases (retirado de Williams, 1999)....	18
Figura 15. Estrutura química do inibidor de β -lactamases avibactam (adaptado de McGuire <i>et al.</i> , 2013).....	19
Figura 16. Distribuição mundial de β -lactamases do tipo CTX-M (adaptado de Davies e Davies 2010).....	20
Figura 17. Sinergismo entre ácido clavulânico e oximinocefalosporinas (setas) e aztreonamo para a detecção de ESBLs pelo método dos discos (à esquerda) e Etest® (à direita) (retirado de Sousa, 2006).....	22
Figura 18. Estirpe de <i>S. marcescens</i> produtora de uma metalo- β -lactamase (Etest®) (retirado de Sousa, 2006).....	25
Figura 19. Distribuição de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de carbapenemases no Mundo (a) e na Europa (b) (adaptado de: a - ECDC, 2011; b - Cantón <i>et al.</i> , 2012)....	28
Figura 20. Elementos genéticos de aquisição e de transferência de genes de resistência aos antibióticos (adaptado de: a – Levy e Marshall, 2004; b - Cantón <i>et al.</i> , 2012).....	31
Figura 21. Transferência horizontal da resistência aos antibióticos através de Plasmídeos (adaptado de Griffiths <i>et al.</i> , 1999).....	32
Figura 22. Estrutura de uma sequência de inserção (A) e de um transposão (B) (adaptado de Brown, 2002).....	34

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estrutura das quatro classes de antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Essack, 2001).....	6
Tabela 2. PBPs de <i>E. coli</i> (adaptado de Sousa, 2006).....	10
Tabela 3. Classificação de β -lactamases segundo Richmond e Sykes (adaptado de Sousa, 2006).....	15
Tabela 4. Agrupamento das β -lactamases segundo Ambler (adaptado de Sousa, 2006).....	16
Tabela 5. Agrupamento das β -lactamases segundo Bush (adaptado de Sousa, 2006).....	16
Tabela 6. Diferentes grupos de β -lactamases de espectro alargado (adaptado de Sousa, 2006).....	21
Tabela 7. Recomendações do NCCLS para a deteção de ESBLs em <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> (adaptado de Sousa, 2006).....	22
Tabela 8. Classificação de carbapenemases (adaptado de Sousa, 2006).....	26

Abreviaturas

β - Beta.

ESBLs - Beta-lactamases de largo espectro.

PBPs – Penicillin binding proteins.

OMPs - Outer membrane proteins.

MBLs - Metalo- β -lactamases.

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético.

ISs - Sequências de inserção.

CMI - Concentração mínima inibitória.

OM - Membrana externa.

MDR - Estirpes multirresistentes.

6-APA - Ácido 6-aminopenicilânico.

TP- Transpeptidases.

TG - Transglicolases.

LPS – Lipopolissacarídeos.

NCCLS - National committee for clinical laboratory standards.

pI - Ponto isoelético.

IRs - Sequências invertidas e repetidas.

tnpA - Enzima transposase.

I Introdução

As bactérias existem desde sempre e são parte integral da vida, dos seres humanos e animais, têm a capacidade de se multiplicar rapidamente e de resistir a diversas situações desfavoráveis à sua multiplicação e manutenção. Essa capacidade de resistência a situações adversas confere-lhes o poder de desenvolver resistência aos antibióticos com os quais contactam (Goossens *et al.*, 2005).

O uso indiscriminado de antibióticos permite uma maior exposição da bactéria ao antibiótico promovendo a aquisição de mecanismos de resistência, resistência essa inevitável e irreversível (DGS, 2013).

O aumento exponencial das taxas de resistência bacteriana aos antibióticos, que se observa na atualidade, constitui um grave problema de saúde pública (OMS, 2015).

Tanto nas infeções nosocomiais como na comunidade a família *Enterobacteriaceae* é uma das mais prevalentes (Cantón *et al.*, 2008).

Esta família é constituída por bacilos de Gram negativo, coexistindo em diferentes nichos ecológicos (Sousa, 2006).

Algumas espécies desta família fazem parte integrante do microbioma intestinal do Homem e dos animais e podem igualmente causar infeções sistémicas, urinárias, entéricas e do trato respiratório inferior (Murray *et al.*, 2003).

Os membros desta família com maior importância clínica para o Homem pertencem aos géneros *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Sousa, 2006).

A resistência aos antibióticos é particularmente relevante em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, podendo surgir estirpes multirresistentes (MDR) aos principais grupos de antibióticos, nomeadamente aos antibióticos β -lactâmicos, uma vez que esta classe é utilizada como antibioterapia de primeira linha no tratamento de infeções causadas por *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006).

1.1 A Família *Enterobacteriaceae*

Os membros desta família caracterizam-se por bactérias anaeróbias facultativas ou aeróbias, catalase positiva e oxidase negativa, com a exceção de *Plesiomonas shigelloides* que se apresentam como oxidase positiva, do ponto de vista bioquímico são descritas pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos, fermentar a glucose com produção de ácidos ou ácido e gás (Figura 1) e com uma capacidade de fermentação de outros açúcares variável (Murray *et al.*, 2003).



Figura 1. Fermentação da glucose em meio de cultura Kligler iron agar (Oxid). A cor amarela no fundo da gelose inclinada indica que a bactéria utiliza fermentativamente a glucose (imagem cedida por J. C. Sousa).

As provas bioquímicas realizadas para a identificação de *Enterobacteriaceae* podem ser efectuadas através de métodos convencionais (em tubo) ou através de métodos semi-automáticos como API e Vitek® (Sousa, 2006).

Medem em média de 1 a 5 μm de comprimento e a maior parte possui flagelos peritricos utilizados na sua locomoção (Figura 2) (Ferreira e Sousa, 2000).



Figura 2. Estrutura ultramicroscópica de *E. coli* (negative staining), sendo visível os flagelos (F) (imagem cedida por J. C. Sousa).

Alguns destes géneros são responsáveis por infeções endógenas oportunistas, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* e outros são responsáveis por infeções exógenas (*Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia* spp.) (Figura 3) (Murray *et al.*, 2003).

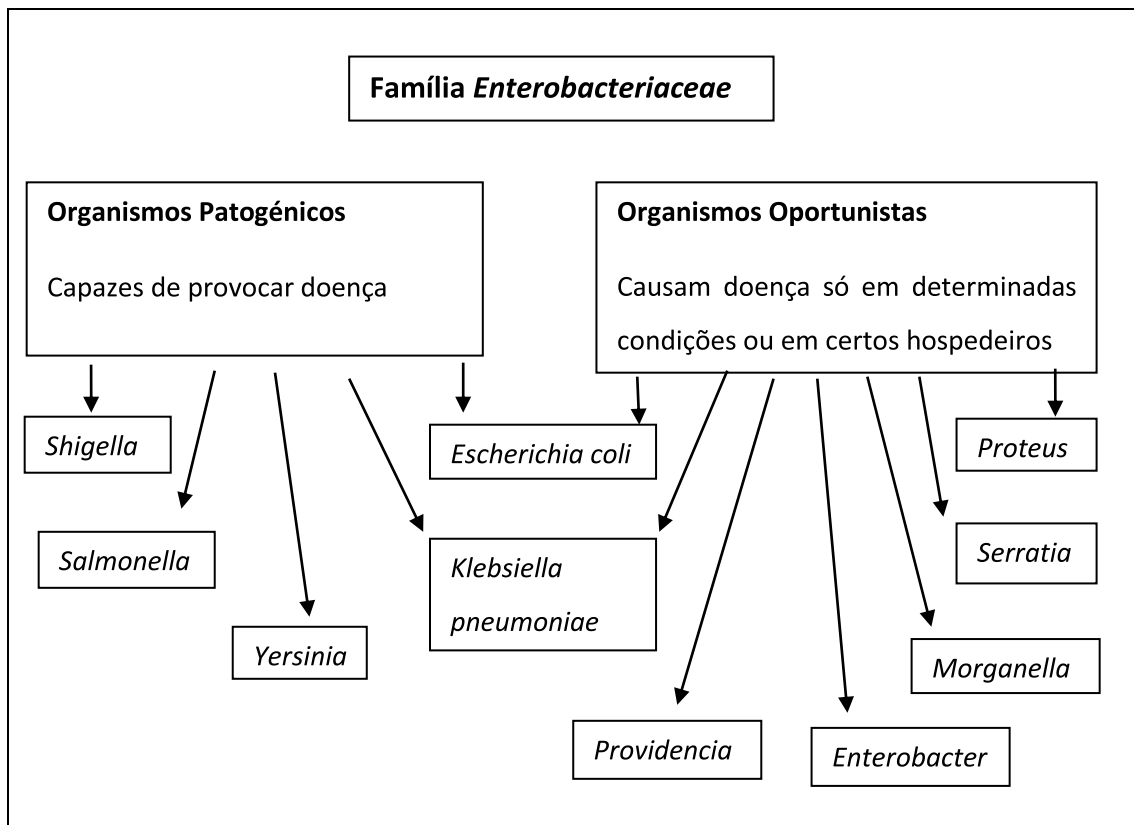


Figura 3. A família *Enterobacteriaceae* (adaptado de Faculty.irsc.edu).

Uma das particularidades de vital importância apresentadas por esta família bacteriana é a sua resistência natural ou adquirida aos antibióticos. A maioria das espécies desta família, já possui por si resistência natural pelo que a aquisição de outros genes de resistência, provenientes de bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes irá complicar o tratamento de infecções por elas provocadas (Murray *et al.*, 2003).

A elevada taxa de resistência aos antibióticos, associada a diversos fatores de virulência (toxinas, cápsula, fatores de aderência, entre outros), converte *Enterobacteriaceae* num problema de saúde pública (Ferreira e Sousa, 2000).

A família *Enterobacteriaceae* é responsável não só pela maioria das infecções nosocomiais como também por infecções na comunidade causando elevada morbilidade e mortalidade assim como aumento dos custos de tratamento (Monteiro, 2000).

A elevada prevalência de *Enterobacteriaceae* MDR a nível hospitalar e na comunidade deve-se principalmente à pressão seletiva exercida pelos antibióticos usados (Perez *et al.*, 2007). Os antibióticos usados em medicina humana são de igual forma utilizados na agro-pecuária, como promotores de crescimento e em medicina veterinária. Estes fatos contribuem para a emergência e disseminação de *Enterobacteriaceae* MDR (Figura 4) (Goossens *et al.*, 2005; Carattoli, 2008).

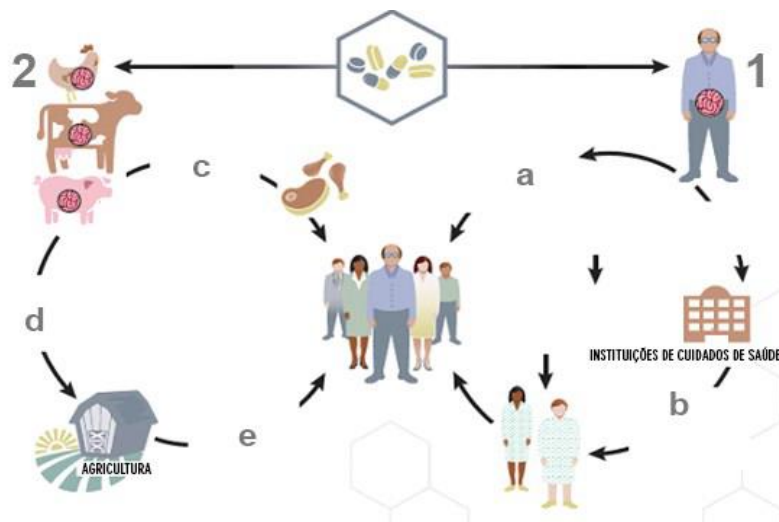


Figura 4. Disseminação de estirpes MDR em diferentes nichos e consequente transmissão ao Homem (adaptado de CDC, 2013).

No combate a estas infecções, os β -lactâmicos e as Quinolonas são os grupos de antibióticos mais usados, uma vez que demonstram elevada eficácia terapêutica e baixa

toxicidade para animais incluindo o Homem (Sousa, 2006). Em contrapartida são os mais associados a mecanismos de resistência em *Enterobacteriaceae* (Gossens *et al.*, 2005).

Dada a elevada incidência de resistências em *Enterobacteriaceae* aos antibióticos β -lactâmicos torna-se urgente adotar critérios para a utilização adequada dos antibióticos, sendo urgente acatar a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento em agro-pecuária e nas aquaculturas (Gossens *et al.*, 2005).

1.2 Antibióticos β -lactâmicos

O primeiro antibiótico β -lactâmico foi “acidentalmente” descoberto por Alexander Fleming, em 1928 como uma substância secretada pelo fungo *Penicillium notatum*, sendo então denominada por “penicilina” (Figura 5) (Fleming 1929).



Figura 5. Alexander Fleming e a descoberta do fungo produtor da Penicilina (retirado de <http://www.infoescola.com/farmacologia/penicilina/>).

Existem quatro grandes classes de β -lactâmicos, diferenciando-se pelo espectro de atividade e propriedades farmacodinâmicas: **penicilinas**, **cefalosporinas**, **monobactâmicos** e **carbapenemos** (Tabela 1) (Essack, 2001).

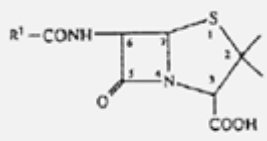
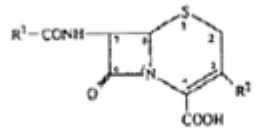
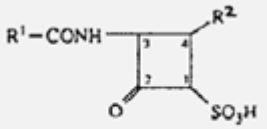
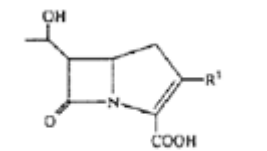
Os antibióticos β -lactâmicos caracterizam-se pela presença comum de uma estrutura cíclica denominada anel β -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um

átomo de azoto, com cadeias laterais que determinam as propriedades farmacocinéticas e antibacterianas das diferentes classes (Tabela 1) (Drawz e Bonomo, 2010; Zeng e Lin, 2013).

O anel β -lactâmico pode estar isolado, como nos monobactâmicos, ou associado em estruturas de anel bicíclico, como nas penicilinas (condensado com um anel de tiazolidina) nas cefalosporinas (fundido com um anel de dihidrotiazina) e nos carbapenemos (combinado com uma cadeia lateral de hidroxietilo) (Tabela 1) (Beceiro *et al.*, 2012).

Esta classe de antibióticos apresenta no entanto alguns inconvenientes, como o fato de poderem ser inativados por hidrolases bacterianas (β -lactamases) (Sousa, 2006).

Tabela 1. Estrutura das quatro classes de antibióticos β -lactâmicos. (adaptado de Essack, 2001).

Classe	Estrutura	Nota
Penicilinas		Consistem de um anel de tiazolidina fundido com o anel β -lactâmico em que as diferentes cadeias laterais de grupos acilos estão ligados a radicais. (ex: ampicilina, amoxicilina, piperacilina).
Cefalosporinas		Possui um anel de di-hidrotiazina fundido ao anel β -lactâmico. (ex: cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e cefepima).
Monobactâmicos		Molécula β -lactâmica monicíclica, inicialmente isolada a partir de <i>Chromobacterium violaceum</i> . (ex: aztreonamo).
Carbapenemos		Assemelha-se às penicilinas, com exceção do anel de cinco elementos em que o átomo de enxofre foi substituído por um átomo de carbono e tem uma ligação dupla entre o carbono 2 e 3. (ex: imipenemo, meropenemo e ertapenemo).

Dado que, poucos anos após a utilização terapêutica da penicilina G (benzilpenicilina) surgiram numerosas estirpes de *S. aureus* resistentes à penicilina, mediada pela ação das penicilinases plasmídicas (β -lactamase da classe A de Ambler), a indústria farmacêutica mobilizou-se na pesquisa de novas moléculas β -lactâmicas anti-estafilocócicas (isoxazolilpenicilinas e meticilina) após a produção do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Figura 6) (Sousa, 2006).

A penicilina G, dada a sua natureza aniônica tem fraca atividade contra bactérias de Gram negativo, sendo desenvolvidas as aminopenicilinas (ex: amoxicilina) com ação contra este grupo de bactérias (Sousa, 2006).

As aminopenicilinas apenas são ativas contra bactérias de Gram negativo não produtoras de β -lactamases. A ocorrência de *Enterobacteriaceae* (ex: *E. coli*) produtoras de β -lactamases plasmídicas (tipo TEM-1) mobilizam no tratamento a utilização de inibidores de β -lactamases (tipo ácido clavulânico) associados a penicilinas, cefalosporinas (2^a a 4^a geração) ou monobactams (aztreonamo) (Sousa, 2006).

Com o aparecimento de *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro alargado (tipo CTX-M), as cefalosporinas tornaram-se ineficazes entre estas estirpes, sendo os carbapenemos (ex: meropenemo) uma das opções terapêuticas (Sousa, 2006).

A frequente utilização de carbapenemos conduziu ao aparecimento de estirpes produtoras de carbapenemases, diminuindo na quase totalidade a opção terapêutica dentro dos antibióticos β -lactâmicos (Sousa, 2006).

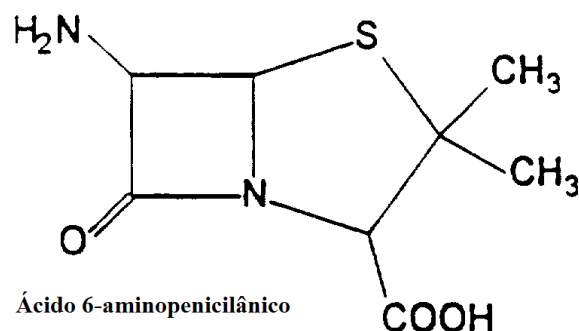


Figura 6. Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (adaptado de <http://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-of-beta-lactam-antibiotics/>).

1.2.1 Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são antibióticos antiparietais que atuam na fase final da biossíntese do peptidoglicano (fase parietal). A biossíntese do peptidoglicano requer a quebra de ligações covalentes no peptidoglicano, por ação das autolisinas bacterianas, para permitir a inserção de novos “tijolos” de peptidoglicano recém-sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana celular bacteriana. Isto pressupõe a intervenção das enzimas transpeptidases (TP) e transglicolases (TG) localizados no folheto externo da membrana celular. As enzimas TP promovem o estabelecimento de pontes interpeptídicas (“cross-linking”) entre cadeias peptídicas vizinhas e as enzimas TG promovem ligações glicosídicas entre N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico no peptidoglicano em crescimento (Sousa, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos inibem irreversivelmente as D-D-carboxitranspeptidases e transglicolases colectivamente conhecidas por PBPs (Penicillin-binding-proteins), impedindo o crescimento do peptidoglicano (Sousa, 2006).

A penicilina forma um complexo com as enzimas, criando-se um composto penicilina-enzima destituído de atividade enzimática (Figura 7) (Sousa, 2006).

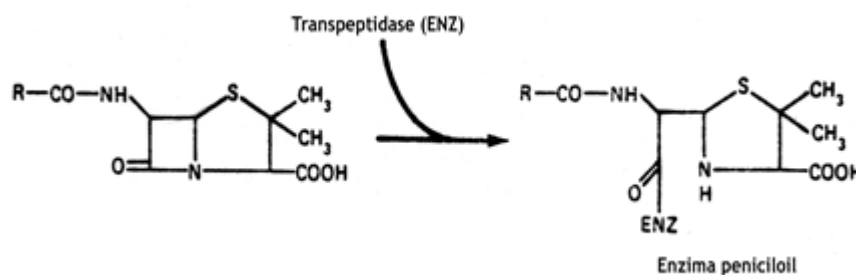


Figura 7. Interação β -lactâmico/transpeptidase (ENZ), formando-se um composto inativo peniciloilenzima (adaptado de Sousa, 2006).

Este mecanismo é explicável dada a analogia estrutural entre a molécula de penicilina e a porção terminal D-alanil-D-alanina, da cadeia peptídica do peptidoglicano (Figura 8).

A penicilina ocupa o lugar do substrato natural não ocorrendo portanto as atividades enzimáticas das PBPs as quais ficam inibidas pelas penicilinas (Sousa, 2006).

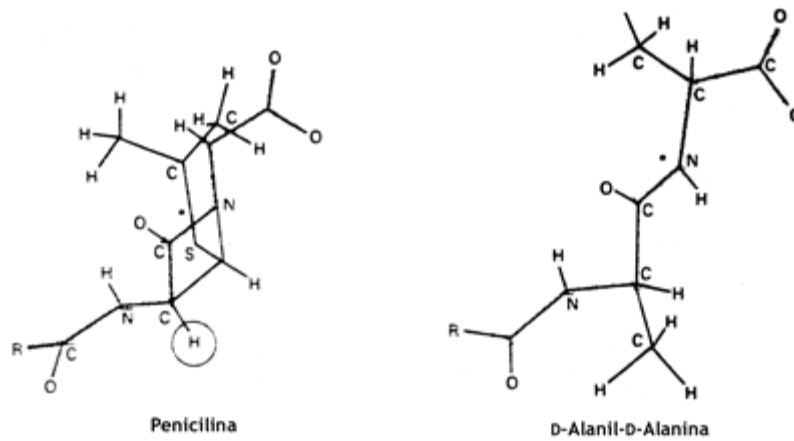


Figura 8. Analogia estrutural entre penicilina e D-alanil-D-alanina (adaptado de Sousa, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos têm de atravessar a parede celular bacteriana e manter a integridade do seu anel β -lactâmico para que possam acilar as PBPs. No caso da destruição do anel β -lactâmico por β -lactamases os antibióticos tornam-se inativos (Sousa, 2006).

A membrana exterior dos bacilos de Gram negativo poderá representar uma barreira de permeabilidade. No entanto, a maioria dos antibióticos β -lactâmicos tem um peso molecular e uma hidrofília compatível com a natureza dos canais de porina, conseguindo por isso atingir o seu local de ação, as PBPs (Sousa, 2006).

Assim sendo, os antibióticos β -lactâmicos ligam-se às PBPs e impedem a síntese do peptidoglicano, causando um desarranjo na cooperação entre a atividade autolítica das autolisinas bacterianas e a síntese do peptidoglicano, causando lise celular (Figura 9) (Sousa, 2006).

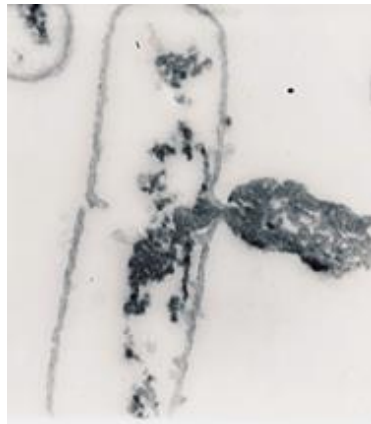


Figura 9. Autólise da célula bacteriana induzida pela Penicilina (adaptado de Sousa, 2006).

O número de PBPs e a natureza destas proteínas varia de espécie para espécie bacteriana (Sousa, 2006).

Em *E.coli* existem 7 PBPs, subdivididos em dois grupos: PBPs de baixo peso molecular e PBPs de alto peso molecular. Por convenção as PBPs são designadas numericamente por ordem de decréscimo dos seus pesos moleculares (Tabela 2) (Sousa, 2006).

Tabela 2. PBPs de *E. coli* (adaptado de Sousa, 2006).

PBPs	PM	Função	Antibióticos com afinidade para as PBPs
1 A	92.000	transpeptidase e transglicolase	penicilina G e cefalosporinas
1 B	85.000	transpeptidase e transglicolase	penicilina G e cefalosporinas
2	66.000	transpeptidase e transglicolase	mecilinamo e imipenemo
3	60.000	transpeptidase e transglicolase	cefalexina, piperacilina e aztreonamo
4	49.000	Carboxipeptidase e endopeptidase	penicilina G, ampicilina e imipenemo
5	42.000	carboxipeptidase	cefexitina
6	40.000	carboxipeptidases	cefexitina

II Resistência a antibióticos β -lactâmicos e seus mecanismos

As bactérias de Gram negativo apresentam diversos mecanismos de resistência natural e adquirida aos antibióticos β -lactâmicos (Cavallo *et al.*, 2008).

Enterobacteriaceae apresentam uma resistência intrínseca que se define como sendo a resistência natural exibida por todos os organismos de determinada espécie, como por

exemplo os organismos de género *Enterobacter* que são naturalmente resistentes à cefoxitina (Cavallo *et al.*, 2008).

A resistência adquirida, que pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de genes veiculados por elementos genéticos móveis ou pela combinação de ambos os mecanismos. A aquisição de genes de resistência faz-se, muitas vezes, através de elementos móveis, tais como plasmídeos, transposões ou integrões. Os genes que codificam β -lactamases surgem como exemplo de genes que são, muitos deles, disseminados por plasmídeos, os quais podem ser facilmente adquiridos por diversas bactérias patogénicas (transferência horizontal) (Honore *et al.*, 1986).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos tem aumentado consideravelmente devido a vários fatores, sendo que essa resistência parece estar a superar a descoberta de novos agentes antimicrobianos. As resistências bacterianas aos antibióticos β -lactâmicos podem resultar de vários fenómenos tais como: modificação dos alvos (PBPs); impermeabilidade da membrana externa; bombas de efluxo; hidrólise enzimática por produção de β -lactamases, o qual representa o mecanismo de resistência de maior prevalência (Figura 10) (Sousa, 2006).

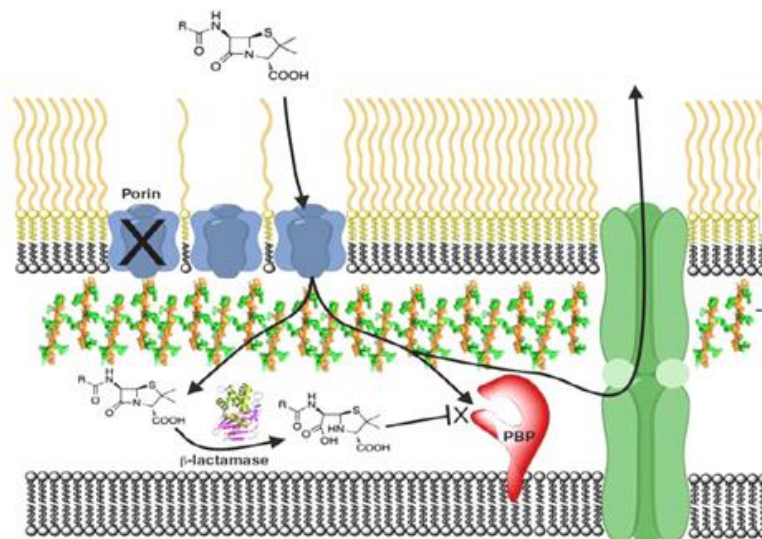


Figura 10. Estrutura da parede celular de bactérias de Gram negativo e mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (adaptado de Llarrull *et al.*, 2010).

2.1 Modificação dos alvos (PBPs)

A modificação dos alvos (PBPs) é um mecanismo de resistência de pouco significado em *Enterobacteriaceae*, ao contrário do que acontece em bactérias de Gram positivo (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) (Sousa, 2006).

2.2 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo em *Enterobacteriaceae* ao promover a expulsão intracelular do antibiótico não permitem que ele possa exprimir em plenitude a sua atividade antibacteriana (Sousa, 2006).

2.3 Impermeabilização da membrana externa

A membrana externa (OM) funciona como barreira de permeabilidade aos antibióticos. É constituída por uma dupla camada lipídica assimétrica, com lipopolissacarídeos (LPS) no folheto externo, fosfolípidos no folheto interno e proteínas porinas que atravessam a OM. Este tipo de organização ocorre nas estirpes selvagens de *Enterobacteriaceae*, mas noutros grupos bacterianos podem existir na OM zonas com duplas camadas fosfolipídicas, o que vai justificar a diferente capacidade de difusão das moléculas de antibióticos em diferentes grupos bacterianos (Di Rienzo e cols, 1978; Lunde e cols, 2009; Nikaido, 1992).

A permeabilidade da OM a agentes hidrofóbicos é reduzida dada a interacção entre as cadeias de ácidos gordos insaturados do LPS, mediada por catiões divalentes (Ca^{2+} e Mg^{2+}), que formam estruturas compactas (Nikaido e col, 1979; Martinez-Martinez, 2008)

A sua reduzida permeabilidade previne o influxo de substratos tóxicos para a bactéria, assim como de moléculas de antibióticos permitindo a sua sobrevivência em ambientes adversos (Martinez-Martinez, 2008).

A parede celular das bactérias de Gram negativo constitui uma barreira à penetração de compostos de elevado peso molecular, de compostos hidrofóbicos e de compostos com carga eléctrica negativa. Por exemplo, em *E. coli* o limite de exclusão é de aproximadamente 600 Da. Antibióticos β -lactâmicos de baixo coeficiente de partilha e

sem carga eléctrica reúnem as condições para permearem os canais de porina da OM (Nikaido e col, 1992; Hancock, 1991).

A OM é considerada um factor de virulência das bactérias de Gram negativo, dado que as torna mais resistentes à ação de substâncias que participam na defesa do hospedeiro infetado, tais como lisozimas, β -lisinas, proteínas dos leucócitos (leucocidinas), sais biliares (com ação detergente) e enzimas digestivas, normalmente ativas contra bactérias de Gram positivo (Forsberg e col, 1971; Nikaido, 2003).

2.4 Hidrólise enzimática dos β -lactâmicos por β -lactamases

As β -lactamases são enzimas plasmídicas ou cromossómicas que hidrolisam uma estrutura comum a todos os antibióticos β -lactâmicos designada por anel β -lactâmico, com hidrólise da ligação amida e conseqüente perda de capacidade de inibição da síntese da parede celular bacteriana causando resistência a estas moléculas (Figura 11) (Abraham e Chain, 1940).

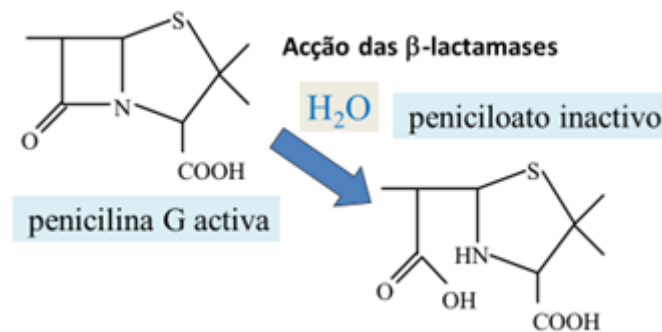


Figura 11. Inativação da penicilina G mediada por penicilinases (adaptado de Guimarães, D *et al.*, 2010).

As β -lactamases produzidas por bactérias de Gram positivo são excretadas para o meio ambiente e nas bactérias de Gram negativo ficam retidas no periplasma (Sousa, 2006).

As β -lactamases mais frequentes são as serino- β -lactamases (contêm serina no centro ativo) acilam os antibióticos β -lactâmicos e quebram a ligação amida do anel β -lactâmico, dando origem a um intermediário acil-enzima, seguido de desacilação (Figura 12) (Sousa, 2006).

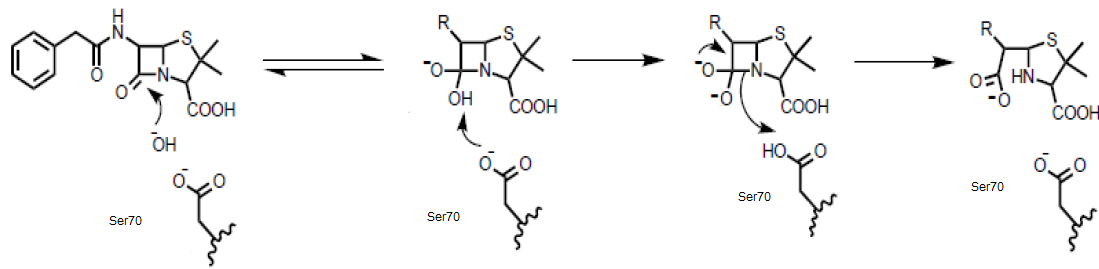


Figura 12. Mecanismo de inativação de antibióticos por β -lactamases com serina no centro ativo (adaptado de Wang *et al.* 1999).

Admite-se que as serino- β -lactamases são emanções das PBPs, havendo alguma homologia de aminoácidos. Os PBPs acilam os β -lactâmicos, mas diferem das β -lactamases dado que a desacilação ocorre lentamente ou não ocorre (Sousa, 2006).

As metalo- β -lactamases (MBLs) têm íões zinco no centro ativo, em vez de serina, e têm um largo espectro degradando os carbapenemos, sendo conhecidas por carbapenemases. Diferem das serino- β -lactamases porque não há a formação do intermediário peniciloilenzima, fazendo o ataque directo ao anel β -lactâmico (Figura 13) (Sousa, 2006).

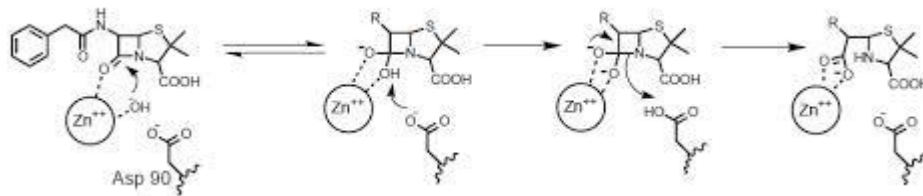


Figura 13. Mecanismo de hidrólise de um β -lactâmico por uma metalo- β -lactamase (adaptado de Wang *et al.* 1999).

As β -lactamases dependendo da sua especificidade são muitas vezes chamadas de penicilinases, cefalosporinases e carbapenemases. As β -lactamases são as principais determinantes da resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos (Sousa, 2006).

III β -lactamases

A detecção das β -lactamases, tanto em bactérias de Gram positivo como em bactérias de Gram negativo, remonta aos inícios dos anos 40, antes do uso generalizado da penicilina em todo o mundo (Abraham e Chain, 1940).

As β -lactamases podem ser detetadas tanto em *Enterobacteriaceae* como noutras espécies bacterianas, como *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* e também nos bacilos de Gram negativo não fermentadores (ex: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) (Summanen *et al.*, 1993; Könönen *et al.*, 1998).

A produção destas enzimas (β -lactamases) explica muitas das vezes a ineficácia dos tratamentos (Sousa, 2006).

3.1 Classificação de β -lactamases

Ao longo dos anos surgiram inúmeras classificações das β -lactamases como resposta á sua descoberta e diversidade (ex: TEM de **T**emoniera, nome da doente onde foi isolada uma estirpe de *E. coli* produtora β -lactamases; OXA, atividade maior contra **o**xacilina; CTX-M, com maior atividade contra **ce**fotaxima ou ainda MIR, **M**iriam Hospital) (Sousa, 2006).

As β -lactamases inicialmente foram agrupadas de acordo com o perfil do seu substrato e sensibilidade aos inibidores das β -lactamases. A 1ª classificação foi proposta por Jack e Richmond (1970), alargada por Richmond e Sykes (1973) (Tabela 3) e actualizada por Sykes e Matthew (1976) com a inclusão do pI (ponto isoelctico) das β -lactamases (Bush e Jacoby, 2010; Sousa, 2006).

Tabela 3. Clasificação de β -lactamases segundo Richmond e Sykes (adaptado de Sousa, 2006).

Classe	β -lactamases
I	cromossómicas (cefalosporinas), inibidas pela cloxacilina e carbenicilina
II	cromossómicas (penicilinas), inibidas pela cloxacilina
III	plasmídicas (TEM-1, TEM-2, etc.), inibidas pelo ác.clavulânico
IV	cromossómicas, não inibidas pela cloxacilina
V	plasmídicas (penicilinas) de largo espectro, inibidas pelo ác. clavulânico

Em 1980 Ambler, de acordo com a sequência de aminoácidos nas moléculas β -lactamases, agrupou-as em classes A, B, C e D (Tabela 4). As β -lactamases da classe A englobam as serino- β -lactamases; as da classe B englobam as metalo- β -lactamases; as da classe C incluem as β -lactamases cromossômicas e as da classe D incluem as oxacilinas (Sousa, 2006).

Tabela 4. Agrupamento das β -lactamases segundo Ambler (adaptado de Sousa, 2006).

Localização	Classe A	Classe B	Classe C	Classe D
Cromossoma	SHV-1 (<i>K. pneumoniae</i>) <i>P. vulgaris</i> <i>C. diversus</i> Bacteroides	Carbapenemases ⁽¹⁾	AmpC ⁽²⁾	OXA-1 OXA-2 PSE-2 OXA-10 ^a OXA-23
Plasmídeos, tranposões	Penicilinas estafilocócicas TEMs SHVs PSE-1	IMP-1	AmpC ⁽³⁾	

(1) Em *S. maltophilia*, *B. cepacia* e *E. faecium*

(2) Em *E. cloacae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *M. morgani*

(3) FOX-1, LAT-1, MIR-1, MOX-1

Em 1995 Bush, Jacoby e Medeiros incorporam as novas β -lactamases e propõem uma classificação que relaciona o perfil do substrato e dos inibidores com a sua estrutura molecular (Tabela 5) (Sousa, 2006).

Tabela 5. Agrupamento das β -lactamases segundo Bush (adaptado de Sousa, 2006).

Grupo 1	Inclui as cefalosporinas cromossômicas de bacilos de Gram negativo que não são inibidas pelo ácido clavulânico (classe Ia, Ib e Id de Richmond e Sykes). As enzimas deste grupo, caracterizadas a nível molecular, pertencem à classe C de Ambler;
Grupo 2	Compreende as β -lactamases inibidas pelo ácido clavulânico e que pertencem às classes moleculares A e D. Este grupo compreende uma grande variedade de enzimas que se distribuem em vários subgrupos de acordo com o perfil de substratos.
Grupo 3	Compreende as metaloenzimas que são capazes de hidrolisar os carbapenemos e não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, pertencentes à classe B de Ambler (Be II, CcrA, CphA, IMP-2, VIM-1; LI e FEZ-1).
Grupo 4	Pouco definido do ponto de vista molecular, compreende as penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico. Estas enzimas não são vulgarmente encontradas.
Subgrupo 2a	Compreende as penicilinas clássicas de bactérias de Gram positivo.

Tabela 5 (Continuação)

Subgrupo 2b	Compreende as β -lactamases de largo espectro como as enzimas TEM-1, TEM-2, SHV-1 e as β -lactamses cromossômicas de <i>Klebsiella</i> .
Subgrupo 2be	Estão incluídas as enzimas que além de terem a capacidade hidrolítica sobre as penicilinas e cefalosporinas clássicas, também atuam sobre a cefoxitina, ceftazidima e aztreonamo, sendo igualmente inibidas pelo ácido clavulânico. As β -lactamases plasmídicas de espectro alargado (ESBLs), cm este comportamento, e algumas enzimas cromossômicas com características idênticas como a K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i> e PER-1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , incluem-se neste subgrupo.
Subgrupo 2bd	Inclui as β -lactamases derivadas de TEM com resistência a inibidores.
Subgrupo 2c	Encontram-se as carbapenecilases (PSE-1, 3 e 4, CARB-3, 4 e 5, BRO-1, 2 e 3, ERA-1 e SAR-1).
Subgrupo 2d	Incluem as oxacilinas (PSE-2, OXA-1, 2, 3 – 22, ARI-1) que inativam a cloxacilina e que são menos inibidas pelo ácido clavulânico do que as carbencilinas.
Subgrupo 2e	Reúne as cefalosporinas codificadas pelo cromossoma e inibidas por baixas concentrações de ácido clavulânico. Inclui ainda as cefalosporinas plasmídicas que hidrolisam a cefoxitina mas que carecem de boa actividade hidrolítica face à penicilina e que são inibidas pelo ácido clavulânico.
Subgrupo 2f	Inclui as carbapenemases que não são metaloenzimas (NmeA, Sme-1, IMI-1).
Subgrupo 3a	São aquelas que hidrolisam as penicilinas aproximadamente tão ou mais rapidamente do que o imipenemo. As cefalosporinas são também rapidamente hidrolisadas por estas enzimas mas mais lentamente que o imipenemo.
Subgrupo 3b	Inclui as enzimas das espécies de <i>Aeromonas</i> que são consideradas as verdadeiras carbapenemases. Estas enzimas têm uma elevada especificidade para hidrolisar os carbapenemos não sendo muitas vezes identificadas em isolados clínicos devido à incapacidade de serem detectadas com o uso do nitrocefim, a cefalosporina cromogénica usada universalmente para a identificação da actividade das β -lactamases.
Subgrupo 3c	Inclui apenas a metalo- β -lactamases de <i>Legionella gormanii</i> . Esta enzima parece ter propriedades bioquímicas diferentes dos outros grupos, apresentando uma elevada actividade enzimática sobre as cefalosporinas e a ampicilina.

3.2 Inibidores das β -lactamases

Em 1976, isolou-se o ácido clavulânico a partir de *Streptomyces clavuligerus*. É um fraco inibidor das PBPs, atuando como inibidor irreversível das β -lactamases da classe A, com capacidade de inibição das enzimas TEM e SHV e *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006).

Outros inibidores como o sulbactam e tazobactam foram desenvolvidos no combate à resistência bacteriana através da hidrólise do anel β -lactâmico pelas β -lactamases (Sousa, 2006).

Tanto o ácido clavulânico como o sulbactam e tazobactam apresentam uma estrutura bicíclica (Figura 14) (Sousa, 2006).

O ácido clavulânico contém um anel β -lactâmico e um anel oxazolidínico, por sua vez o sulbactam é uma sulfona do ácido penicilânico com capacidade também de inibir as β -lactamases da classe A e por fim o tazobactam inibe β -lactamases da classe A, algumas da classe D e da classe C (*M. morganii*) (Figura 14) (Williams, 1999).

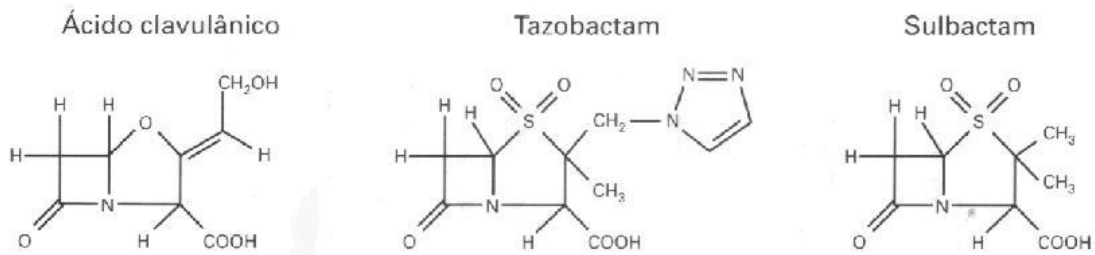


Figura 14. Estrutura dos inibidores das β -lactamases (retirado de Williams, 1999).

Nenhum dos inibidores inibe as metalocarbapenemases, nem as β -lactamases cromossômicas AmpC exceto Tazobactam contra *M.morganii* (Sousa, 2006).

Estes inibidores são reconhecidos como substrato pelas β -lactamases, ligam-se covalentemente e ocorrem rearranjos e quebra de ligações, ficando irreversivelmente ligados às β -lactamases. São consideradas por isso inibidores suicidas (Sousa, 2006).

Na terapêutica, o ácido clavulânico tem sido associado à amoxicilina e à ticarcilina, o sulbactam ligado quimicamente à ampicilina e à cefoperazona, e por fim o tazobactam à piperacilina (Sousa, 2006).

Além dos inibidores das β -lactamases, que apresentam uma estrutura β -lactâmica, existem os inibidores sem estrutura β -lactâmica. Estes foram desenvolvidos com o objectivo de melhorar a atuação dos antibióticos β -lactâmicos em bactérias produtoras de diferentes tipos de β -lactamases, tendo a capacidade de acilar covalentemente o alvo serina das β -lactamases da classe A e C e algumas da classe D de Ambler, sem inibir as de classe B (Mcguire *et al.*, 2013).

Estes inibidores de nova geração são inovadores, mas ainda carecem de alguns estudos. Apresentam a capacidade de inibir β -lactamases de um espectro mais alargado que os inibidores com estrutura β -lactâmica. Entre esta nova geração de inibidores, destaca-se

o avibactam, caracterizado como sendo um inibidor de β -lactamases com uma estrutura química não β -lactâmica chamada de diazabicyclooctanos (Figura 15) (Mcguire *et al.*, 2013).

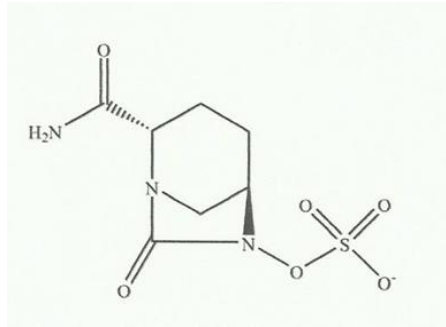


Figura 15. Estrutura química do inibidor de β -lactamases avibactam (adaptado de Mcguire *et al.*, 2013).

O avibactam inibe a maioria das β -lactamases da classe A (por exemplo, TEM-1, SHV-1, KPC-2 e CTX-M-15), β -lactamases da classe C de Ambler e também algumas da classe D (ex: OXA-48). Não tem, no entanto, actividade sobre as metalo-carbapenemases também conhecidas por carbapenemases da classe B de Ambler, algumas carbapenemases OXA (ex: OXA-23) e carbapenemases NDM (classe A) (Mcguire *et al.*, 2013).

O sucesso do inibidor avibactam deve-se ao facto de inibir as β -lactamases por acilação rápida, possuindo depois uma baixa velocidade de desacetilação (Mcguire *et al.*, 2013).

3.3 β -lactamases de largo espectro (ESBLs)

Mutações nos genes de resistência aumentam o espectro de atividade das β -lactamases, sendo estas denominadas como β -lactamases de espectro alargado (ESBLs) (Philippon *et al.*, 1989).

Inicialmente a maioria das ESBLs derivadas das TEM-1, TEM-2 e SHV-1, por mutações pontuais no seu centro ativo, degradavam mais eficazmente a ceftazidima que a cefotaxima e por isso são conhecidas por ceftazimidases (Sousa, 2006).

As enzimas ESBL são capazes de hidrolisar as cefalosporinas, como a cefotaxima e ceftazidima, e os monobactâmicos (aztreonamo). Estas enzimas surgem não só pela pressão seletiva exercida sobre os microrganismos, como também pela troca de genes de resistência entre eles, através de diferentes mecanismos, tais como: plasmídeos, transposões, integrões e sequências de inserção (Jacoby e Medeiros, 1991).

Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae* são as principais espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs.

A maior incidência de ESBLs ocorre em ambiente hospitalar, nomeadamente em unidades de cuidados intensivos uma vez que é um local de elevado consumo de cefalosporinas de largo espectro, embora hoje sejam comuns na comunidade (Pitout *et al.*, 2005).

As ESBLs de origem plasmídica conferem às estirpes resistência às oximinocefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime e cefpiroma) e ainda ao aztreonamo. Não são ativas contra cefamicinas (cefotetan e cefoxitina), inibidores das β -lactamases e carbapenemos (Sousa, 2006).

Presentemente a maioria das ESBLs degradam mais eficazmente a cefotaxima do que as outras cefalosporinas, sendo por isso designadas por CTX-M. Existem diversas β -lactamases CTX-M com mais de 30 alelos, divididas em 5 grupos filogenéticos que estão mundialmente distribuídas (Figura 16) (Bonnet, 2004; Novais *et al.*, 2010).

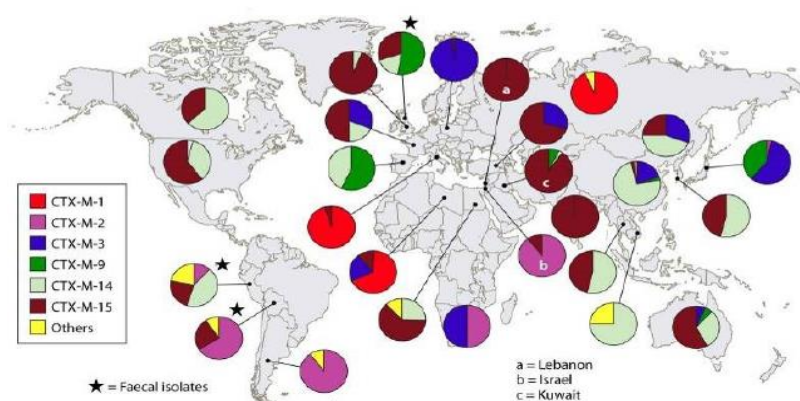


Figura 16. Distribuição mundial de β -lactamases do tipo CTX-M (adaptado de Davies e Davies 2010).

A epidemiologia de *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15 tem sido descrita em diversos países incluindo Rússia, Índia, Itália, Inglaterra, Áustria, Espanha, Portugal,

Suécia, França, C nada e Estados Unidos da América. *Escherichia coli* produtora de CTX-M-15   end mica na  ndia, representando este País um relevante reservatório destas β -lactamases (Peirano e Pitout, 2010).

Outras ESBLs pertencem   família OXA, grupo bastante heter geneo. Diferem das ESBLs, derivadas das TEM e SHV, pois pertencem ao grupo D de Ambler e caracterizam-se pela sua atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina e pelo fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. Conferem fraca resistência às oximinocefalosporinas, exceto   ceftazidima. Estas enzimas encontram-se preferencialmente em *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006).

Outras ESBLs têm sido descritas mas com menos incidência como: PER-1, PER-2, CME-1, VEB-1, TLA-1, SFO-1 e GES-1 (Tabela 6) (Sousa, 2006).

Tabela 6. Diferentes grupos de β -lactamases de espectro alargado (adaptado de Sousa, 2006).

ESBLs	B-lactamase (origem)	País	Espécie
TEM	TEM 1 e 2	França	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1	Alemanha	<i>P. aeruginosa</i>
CTX-M	KLUA	Alemanha	<i>E.coli, Salmonella spp.</i>
OXA	OXA – 10	Turquia	<i>P.aeruginosa</i>
PER		França	<i>P.aeruginosa</i>
VEB	PER	Vietnam	<i>E.coli</i>
TLA	CME – 1	México	<i>E.coli</i>
GES		África Sul	<i>K.pneumoniae</i>
BES	<i>Y. enterocolitica</i>	Brasil	<i>S.marcescens</i>
SFO	AmpA <i>S.fontiola</i>	Japão	<i>E.cloacae</i>

3.4 Detec o laboratorial de ESBLs

A detec o laboratorial de ESBLs em *Enterobacteriaceae*   problemática quando coexistem outros mecanismos de resistência, nomeadamente AmpC e altera es das porinas (Sousa, 2006).

Segundo a NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) uma estirpe de *K.pneumoniae* ou *E. coli* com CMI > 2 μ g/mL (Tabela 7) para oximinocefalosporinas pode indicar uma ESBL ou quando no método dos discos de difusão em agar se

observar o sinergismo entre as cefalosporinas de 3^o geração e o ácido clavulânico (teste do duplo disco) (Figura 17) (Sousa, 2006).

Tabela 7. Recomendações do NCCLS para a detecção de ESBLs em *E. coli* e *K. pneumoniae* (adaptado de Sousa, 2006).

Método dos discos	Critério	Eteste®	Critério
Cefpodoxima (10g)	< 17mm		
Cefotaxima (30g)	< 27mm	+ ácido clavulânico (30+10g)	≥ 5mm
Ceftriaxona (30µg)	< 25mm		
Ceftazidima (30µg)	< 22mm	+ ácido clavulânico (30+10g)	≥ 5mm
Aztreonamo (30µg)	< 27mm		
Diluição em caldo:			
Cefpodoxima	≥ 8µg		
Cefotaxima	≥ 2µg	+ ácido clavulânico	≥ 3 dil.
Ceftriaxona	≥ 2µg		
Ceftazidima	≥ 2µg	+ ácido clavulânico	≥ 3 dil.
Aztreonamo	≥ 2µg		

A detecção de ESBLs também pode ser analisada com tiras Etest® de oximinocefalosporinas com e sem ácido clavulânico (Sousa, 2006) (Figura 17).

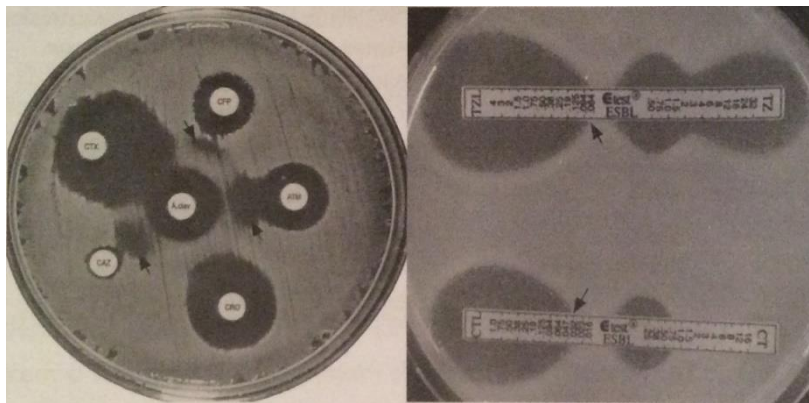


Figura 17. Sinergismo entre ácido clavulânico e oximinocefalosporinas (setas) e aztreonamo para a detecção de ESBLs pelo método dos discos (DDST) (à esquerda) e Etest® (à direita) (retirado de Sousa, 2006).

CTX, CT – cefotaxima; CAZ, TZ – ceftazidima; CFP – cefoperazona; CRO – ceftriaxona; ATM – aztreonamo; CTL – cefotaxima + ácido clavulânico; TZL – ceftazidima + ácido clavulânico

(fotografia de Etest® cedida pela AB BIODISK).

Os sistemas de detecção automáticos (ex: Vitek®) já incluem cefotaxima+ácido clavulânico e ceftazidima+ácido clavulânico para a detecção de ESBLs (Sousa, 2006).

A detecção do pI também assume influência na detecção de ESBLs, uma vez que as ESBLs derivadas de TEM têm um pI entre 5,2 - 6,5; as derivadas de SHV têm um pI entre 7,0 - 8,2 e as CTX-M têm um pI entre 7,6 - 9,0 (Sousa, 2006).

Também podem ser usadas técnicas de biologia molecular para a detecção de ESBLs, nomeadamente sondas de DNA e técnicas de amplificação (PCR) (Pitout *et al.*, 2005).

As ESBLs podem ser camufladas quando o microrganismo suspeito coexpressa β -lactamases AmpC cromossômicas ou plasmídicas. Estas podem interferir com os testes de sinergismo com o ácido clavulânico (Sousa, 2006).

Há vantagens em usar adicionalmente cefepime (cefalosporina de 4º geração), estável às AmpC e lábil às ESBLs e usar tazobactam também como inibidor, visto que não provoca o efeito de indução (Sousa, 2006).

A existência de múltiplas estirpes produtoras de ESBLs e a sua fácil disseminação constitui um severo problema de saúde pública (Pitout *et al.*, 2005).

Os isolados ESBLs devem ser considerados resistentes a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenemos e inibidores de β -lactamases (Sousa, 2006).

Dado que os genes de resistência das estirpes ESBLs se localizam em integrões contendo cassetes de resistência a outros grupos de antibióticos, diminui fortemente as opções terapêuticas (Sousa, 2006).

Os carbapenemos e a ciprofloxacina têm sido referidos como possíveis alternativas terapêuticas. No entanto, corre-se o risco de aumentar a incidência de carbapenemases em ambientes hospitalares (Sousa, 2006).

Tem sido observada uma forte correlação entre a produção de ESBLs em *Klebsiella pneumoniae* e a maior capacidade de aderência às células epiteliais (Sousa, 2006).

IV β -lactamases do tipo AmpC

As β -lactamases AmpC cromossômicas foram descritas em bacilos de Gram negativo associadas a infecção nosocomial (ex: *Citrobacter freundii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*) (Sousa, 2006).

Estas β -lactamases inibem as penicilinas, as cefalosporinas (exceto as de 4ª geração) e os inibidores das β -lactamases, os monobactams, sendo os carbapenemos a única alternativa dentro da família β -lactâmica (Livermore, 1995).

Por exemplo, o gene AmpC cromossômico que codifica estas β -lactamases está integrado num operão que controla a sua expressão. Certos antibióticos como a cefoxitina e o ácido clavulânico induzem a produção da enzima AmpC. Os carbapenemos causam o mesmo efeito mas não perdem a sua atividade antibacteriana (Livermore, 1995).

Existem estirpes de *E. cloacae* desreprimidas na produção de AmpC, as quais exibem resistência bacteriana sem a necessidade de indução antibiótica, produzindo constitutivamente as AmpC (Sousa, 2006).

Em algumas espécies como *E. coli* e *Shigella* spp. o gene que codifica para este tipo de enzimas (blaAmpC) não é indutível e a sua expressão é baixa, fazendo com que essas bactérias produzam constitutivamente níveis residuais de enzima (Pérez-Pérez *et al.*, 2002).

A localização plasmídica destas β -lactamases (qAmpC) veio agravar o problema pois podem disseminar facilmente entre as diferentes espécies bacterianas (Sousa, 2006).

A prevalência deste tipo de enzimas tem vindo a aumentar sobretudo em *E. coli* e *K. pneumoniae* e *E. cloacae* (Philippon *et al.*, 2002).

V Carbapenemases

Os carbapenemos são os antibióticos β -lactâmicos de maior espectro de atividade, dada a sua facilidade de difusão através dos canais de porina da membrana externa e elevada estabilidade à hidrólise por β -lactamases (Sousa, 2006).

Os carbapenemos são considerados a primeira linha de tratamento de infecções causadas por microrganismos da família *Enterobacteriaceae* produtores de β -lactamases de espectro alargado, sendo que o seu uso no tratamento de infecções provocou uma pressão seletiva nas bactérias patogênicas, levando à emergência das carbapenemases e à diminuição das opções terapêuticas (Nordmann *et al.*, 2009).

Em 1966, antes da utilização terapêutica dos carbapenemos foi isolada em *B. cereus* uma β -lactamase capaz de hidrolisar os carbapenemos, denominada carbapenemase (Sousa, 2006).

Estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenemos como o iminepeno e meropenemo (Souha *et al.*, 2011).

As carbapenemases da classe A, como as KPC, e as da classe D, como a OXA-48, apresentam serina no centro activo e as carbapenemases da classe B, denominadas metalo- β -lactamases (VIM, IMP e NDM) apresentam ião zinco no centro ativo (Cornaglia *et al.*, 2011; Tzouvelekis *et al.*, 2012).

As metalo- β -lactamases são de largo espectro, abrangendo todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonamo. Não são inibidas pelos inibidores das β -lactamases, mas sim por EDTA, quelante dos iões metálicos (Sousa, 2006).

Presentemente é possível a detecção de metalo- β -lactamases usando tiras Etest® de carbapenemo imipenemo, contendo numa das metades da tira Etest® adicionalmente uma concentração constante de EDTA associado ao imipenemo (Figura 18) (Sousa, 2006).

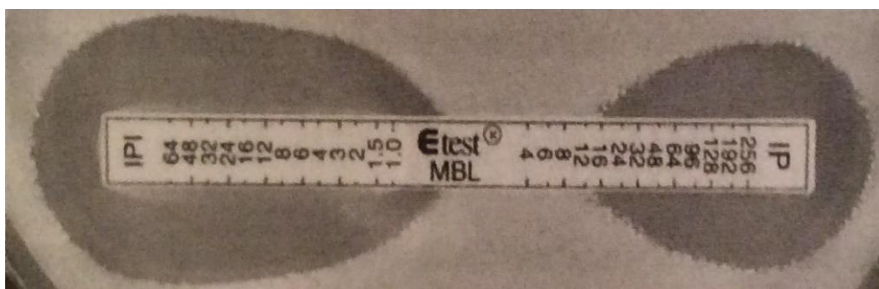


Figura 18. Estirpe de *S. marcescens* produtora de uma metalo- β -lactamase (Etest®) (retirado de Sousa, 2006).

IP – imipenemo (CMI 16 μ g/mL); IPI – imipenemo + EDTA (CMI < 1 μ g/mL)

(fotografia cedida pela AB BIODISK)

A primeira metalo- β -lactamase foi isolada em *P. aeruginosa*, em Itália (VIM-1 – Verona-imipenemo-metalocarbenemase). A VIM-1 tem a fraca homologia de 31,4% com a IMP-1. A VIM-2 foi isolada em França e em Portugal (cit. in Sousa, 2006).

As metaloenzimas pertencem à classe B de Ambler e são distribuídas por 3 subclasses B1, B2 e B3. Encontram-se em plasmídeos ou em cromossomas e são associados com integrões 1, apesar de as IMP serem também encontradas em integrões 3 (cit. in Sousa, 2006).

As carbapenemases da classe A de Ambler hidrolizam com mais eficácia os novos carbapenemos, meronemo e biperideno do que o imipenemo. São inibidas pelos inibidores das β -lactamases, excepto a Sme-1 (Stuart *et al.*, 2011).

As carbapenemases do tipo OXA (classe D) exibem um fraco poder hidrolítico sobre os carbapenemos, o que as distingue das outras carbapenemases (Tabela 8) (Nordmann *et al.*, 2012; Birgy *et al.*, 2012; Bush, 2013).

Tabela 8. Classificação de carbapenemases (adaptado de Sousa, 2006).

β -lactamase	Microrganismo	Local origem	de Ano isolamento	de Localizaçao genetica
1. Classe A de Ambler (1980) e grupo 2f de Bush <i>et al.</i> (1995)				
Sme-1	<i>Serratia marcescens</i> S6	Reino unido	1982	Cromosoma
	<i>S. marcescens</i> 4176	EUA	1985	Cromosoma
NMC-A	<i>Enterobacter cloacae</i> NOR-1	França	1990	Cromosoma
IMI-1	<i>E. cloacae</i> 1413B	EUA	1984	Cromosoma
Sme-2	<i>S. marcescens</i> 4126	EUA	1992	Cromosoma
	<i>S. marcescens</i> 4124	EUA	1994-1999	Cromosoma
KPC-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA		Plasmídeo
GES-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GW-1	África do Sul	2000	Plasmídeo (Int. Clas. 1)
2. Classe D de Ambler (1980) e grupo 2d de Bush <i>et al.</i> (1995)				
OXA-23 (ARI-1)	<i>Acinetobacter baumannii</i> 6B92	Escócia	1985	Plasmídeo
ARI-2	<i>A. baumannii</i> A148	França	1989	
Oxacilinase	<i>A. baumannii</i> HCT 3, 15 E 19	Argentina	1995	Cromosoma
OXA-24	<i>A. baumannii</i> RYC 52763/97	Espanha	1997	Cromosoma
OXA-25	<i>A. baumannii</i> 327009	Espanha		Cromosoma
OXA-26	<i>A. baumannii</i> 04737	Bélgica		Cromosoma
OXA-27	<i>A. baumannii</i> I-16	Singapura		Cromosoma
OXA-33	<i>A. baumannii</i>	Portugal	2002	Plasmídeo
3. Classe B de Ambler (1980) e grupo 3 de Bush <i>et al.</i> (1995)				

Tabela 8 (Continuação)

Sub-classe B1				
Bell	<i>Bacillus cereus</i> 569/H <i>Bacillus sp.</i> 170 <i>B. cereus</i> 5/B/6			
CcrA3	<i>Bacteroides fragilis</i> QMCN3			
CcrA4	<i>B. fragilis</i> QMCN4			
CcrA4 (CfiA)	<i>B. fragilis</i> TAL3636 <i>B. fragilis</i> TAL2480			
Blab	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>			Cromosoma
Blab3	<i>C. meningosepticum</i> NCTC10016 <i>C. meningosepticum</i> 97/P/5448	Reino Unido		Comosoma
IND.1 a-4	<i>C. indolegenes</i>	França	1997-1999	Cromosoma
IMP.1	<i>P. aeruginosa</i> GN17203 <i>S. marcescens</i> TN9106 <i>S. marcescens</i> AK9373 <i>P. aeruginosa</i> 101/1477 <i>K. pneumoniae</i> DB96 <i>Acinetobacter junii</i> 1411	Japão Japão Japão Japão Singapura Reino Unido	1993 1996 2000	Plasmídeo Cromosoma Plasmídeo (int. Clas. 3) Plasmídeo (int. Clas. 3) Plasmídeo (int. Clas. 3)
IMP-2	<i>A. baumannii</i> AC 54/97	Itália	1997	(integração de classe 1)
IMP-3	<i>Shigella flexneri</i> JS19622	Japão	1998	Plasmídeo (Int. Clas. 1)
IMP-4	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Citrobacter youngae</i>	Hong-Kong R. Pop. China	1994-1998	Cromosoma (int. Clas. 1) Plasmídeo (Int. Clas. 1)
IMP-5	<i>A. baumannii</i>	Portugal	2002	plasmídeo
IMP-6	<i>S. marcescens</i> KU3838	Japão	1996	Plasmídeo (Int. Clas. 1)
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Canadá	1995-1996	(integração de classe 1)
IMP-8	<i>K. pneumoniae</i> KPO787	Taiwan	1998	Plasmídeo (Int. Clas. 1)
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i> VR-143/97 <i>Achromobacter xylosoxidans</i> AX-22	Itália Itália	1997 1998	Cromosoma (int. Clas. 1) Plasmídeo (int. Clas. 1)
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i> COL-1 <i>P. aeruginosa</i> RON-1 <i>P. aeruginosa</i> RON-2 <i>P. aeruginosa</i> 174 <i>A. baumannii</i>	França França França Grécia Coreia	1996 1998 1997 1998-1999	Plasmídeo (Int. Clas. 1) Cromosoma (int. Clas. 1) Cromosoma (int. Clas. 1) Cromosoma (int. Clas. 1) Cromosoma (int. Clas. 1) (integração de classe 1)

Tabela 8 (Continuação)

	<i>P. aeruginosa</i>	Portugal	1995-1998	(integração de classe 1)
VIM-3	<i>Pseudomonas spp.</i>	Taiwan	1997-2000	Cromosoma
Sub-classe B2				
CphA (CphA2)	<i>Aeromonas hydrophila</i>			
Imis	<i>A. veronia</i> bv. <i>Sobria</i> 163 ^a			
Sfh-1	<i>Serratia fonticola</i>	Portugal		
Sub-classe B3				
Li	<i>S. maltophilia</i> GN12873 e <i>S. Maltophilia</i> ULA-511			
GOB	<i>C. meningosepticum</i>			Cromosoma
FEZ-1	<i>Legionella gormanii</i> ATCC 33297T			Cromosoma
THIN-B	<i>Janthinobacterium lividum</i>			

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases surgiram de forma preocupante a partir de 2011 em todo o mundo (Cantón *et al.*, 2012) (Figura 19). Diversos fatores têm sido descritos como responsáveis pela prevalência elevada de carbapenemases como relações históricas e culturais, migração, viagens e turismo (Cantón *et al.*, 2012).

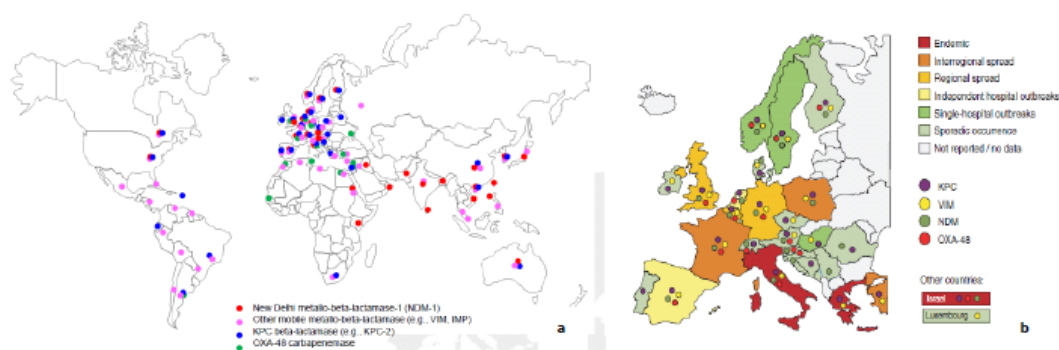


Figura 19. Distribuição de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases no Mundo (a) e na Europa (b) (adaptado de: a - ECDC, 2011; b - Cantón *et al.*, 2012).

5.1 KPC

As enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) são carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler. São inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam e

detêm a capacidade de hidrolisar uma enorme variedade de β -lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, aztreonamo e carbapenemos (Queenan e Bush, 2007).

O primeiro membro da família KPC, designado como KPC-1, foi isolado de uma *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenemos nos Estados Unidos em 1996. Este isolado exibiu resistência ao imipenemo e meropenemo (CMI 16 μ g/mL), às cefalosporinas de largo espectro e ao aztreonamo (Yigit *et al.*, 2001).

A descoberta de KPC-1 foi rapidamente seguida de vários relatos nos Estados Unidos de uma variante, que possuía um aminoácido diferente (Ser(174) \rightarrow Gly), denominada KPC-2, mais tarde surgiram estirpes de *K. pneumoniae* com uma modificação de um aminoácido (His(272) \rightarrow Try) que determinou uma nova KPC (KPC-3) (Navon-Venezia *et al.*, 2006; Bradford *et al.*, 2004; Bratu *et al.*, 2005).

Recentemente no centro hospitalar de Vila Nova de Gaia, Portugal foram registados 30 casos de KPC com elevado perfil de resistência (DGS, 2015).

Para a deteção das enzimas KPC a microdiluição em caldo foi o método mais sensível (acima de 90%) para a identificação de resistência aos carbapenemos. Vitek 2®, MicroScan®, E-test® e dico-difusão obtiveram mais de 90% de sensibilidade na deteção de resistência aos carbapenemos quando usaram o ertapenemo, o qual representa o melhor marcador para deteção de KPC, uma vez que quando avaliada a susceptibilidade ao imipenemo e meropenemo pelos diversos métodos, estes demonstraram baixa sensibilidade. Porém, testes com imipenemo e meropenemo foram mais específicos que os testes com ertapenemo (Andrade *et al.*, 2006).

Para confirmar a presença de KPC e outras carbapenemasases recorre-se a técnicas de biologia molecular (Bradford *et al.*, 2004; Hossain *et al.*, 2004; Yigit *et al.*, 2003).

VI Epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs

Relativamente à epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs a situação não é favorável. Estudos revelam que a frequência do aparecimento de estirpes multirresistentes pela produção de ESBLs é cada vez maior, contudo estas bactérias são menos frequentes na Europa do que na América Latina, Ásia e regiões do Pacífico, com

a exceção da América do Norte onde há uma menor incidência destas bactérias (Coque *et al.*, 2008).

A epidemiologia de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em Portugal, mostrou a elevada prevalência destas enzimas (Bouchillon *et al.*, 2004).

Segundo alguns dos estudos efetuados a prevalência deste tipo de bactérias tem aumentado ao longo do tempo de uma forma exponencial, com o predomínio crescente de isolados de *E. coli* produtoras de CTX-M (Machado *et al.*, 2006, Machado *et al.*, 2007, Machado *et al.*, 2009).

Os estudos sobre a prevalência e incidência deste tipo de bactérias são de extrema importância e apresentam como finalidade a deteção de estirpes produtoras destas enzimas, com a maior brevidade possível, a fim de evitar a disseminação da infeção causada por estes agentes (Sousa, 2006).

VII Mecanismos de disseminação de genes de resistência em *Enterobacteriaceae*

São vários os fatores que contribuíram para a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Cantón *et al.*, 2008).

A dispersão clonal bem como a transferência horizontal de genes constituem uma importante forma de dispersão de genes de resistência em *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Cantón *et al.*, 2003).

Ao longo das últimas décadas temos presenciado, não só ao desenvolvimento de uma infinidade de novos mecanismos de resistência, mas também a sua transmissão e propagação por e para toda a população bacteriana (Cantón *et al.*, 2008).

Vários elementos estão presentes na transferência de genes, sendo que esta movimentação de genes pode ocorrer a nível intra e intercelular. A nível intracelular, os genes de resistência podem movimentar-se no cromossoma, e/ou entre este e os plasmídeos, se inseridos em elementos genéticos móveis. A nível intercelular, o movimento dos genes de resistência (transferência horizontal de genes) é devido a três mecanismos: **transformação** (aquisição e incorporação de fragmentos de DNA estranho presentes no ambiente, originados de bactérias lisadas), **transdução**

(transferência de informação genética de uma bactéria para outra através de bacteriófagos) e **conjugação** (transferência de material genético de uma bactéria para outra através de plasmídeos conjugativos, que se mantêm estáveis na bactéria recetora e/ou se recombinam com o material genético da bactéria recetora) (Figura 20) (Murray *et al.*, 2003).

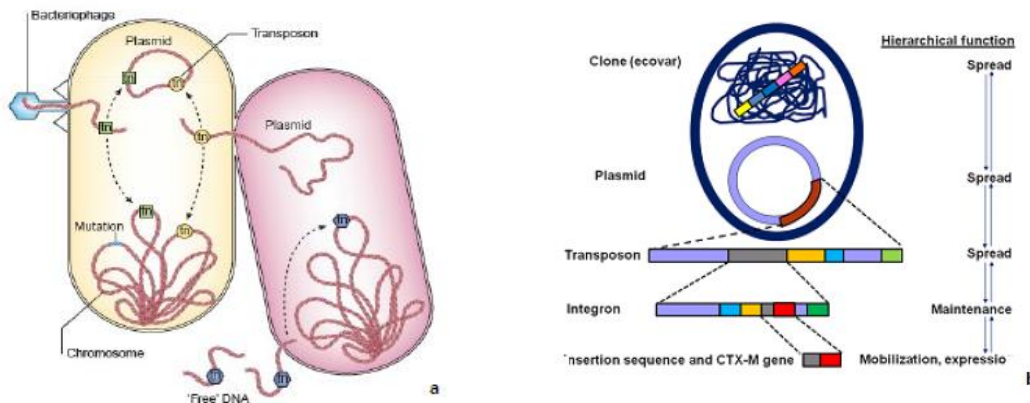


Figura 20. Elementos genéticos de aquisição e de transferência de genes de resistência aos antibióticos (adaptado de: a – Levy e Marshall, 2004; b - Cantón *et al.*, 2012).

7.1 Dispersão clonal

Os genes que codificam para a resistência aos antibióticos são transmissíveis à descendência aquando da replicação do DNA, assim sendo as bactérias resistentes constituem um importante mecanismo de disseminação de genes de resistência a antibióticos. Reunidas as condições para o sucesso epidémico, como por exemplo a aquisição de fatores de virulência ou aquisição de genes que lhes permite a manutenção em diversas situações menos favoráveis, estes microrganismos reúnem todas as condições para se disseminar em grande escala e consequentemente disseminar os genes de resistência que albergam (Morosini *et al.*, 2006).

Um dos exemplos da dispersão clonal é a rápida disseminação do clone *E. coli* O25:H4-ST131, pertencente ao grupo filogenético B2, que se encontra associado à pandemia de CTX-M-15 (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

7.2 Transferência horizontal de genes

A transferência de material genético para uma célula que não é sua descendente é designada como transferência horizontal de genes. Os veículos genéticos que

transportam os genes são distintos e abrangem uma grande variedade de transposões, os quais podem por sua vez estar situados em plasmídeos conjugativos (Figura 21) (Poirel *et al.*, 1999; Partridge *et al.*, 2005).

7.2.1 Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos genéticos móveis transferíveis constituídos por DNA extra-cromossômico, de cadeia dupla circular ou linear, com capacidade de replicação autônoma confinados ao cromossoma bacteriano (Carattoli, 2011; Beceiro *et al.*, 2012; El Salabi *et al.*, 2013). Na região variável do plasmídeo encontram-se genes responsáveis pelas funções adaptativas, nomeadamente genes que codificam resistência aos antibióticos, fatores de virulência (Beceiro *et al.*, 2012) e produção de bacteriocinas, característica que facilita a disseminação bem-sucedida dos plasmídeos entre diferentes espécies bacterianas (Carattoli, 2011; El Salabi *et al.*, 2013).

Em bacilos de Gram negativo o mecanismo de transferência horizontal prevalente responsável pela transferência de genes de resistência aos antibióticos em bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes é o processo de conjugação (Carattoli, 2011; Beceiro *et al.*, 2012; Carattoli, 2013). Estes elementos genéticos móveis podem conferir resistência às principais classes de antibióticos nomeadamente β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, macrólidos, quinolonas e trimetoprim, que podem estar contidos no mesmo plasmídeo. Os plasmídeos dos grupos IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN e IncII estão associados a epidemias de *Enterobacteriaceae* multirresistentes aos antibióticos (Figura 21) (Carattoli, 2011).

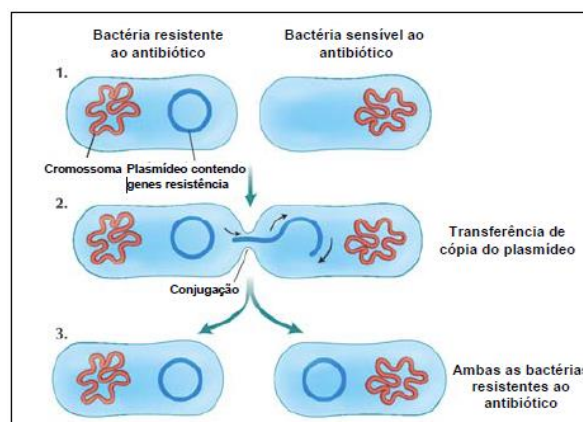


Figura 21. Transferência horizontal da resistência aos antibióticos através de Plasmídeos (adaptado de Griffiths *et al.*, 1999).

7.2.3 Integrões

Os integrões são estruturas genéticas não transmissíveis com capacidade de captação e integração de vários genes de resistência aos antibióticos (Cantón e Ruiz-Garbajosa, 2011; Beceiro *et al.*, 2012; El Salabi *et al.*, 2013), podem estar associados a transposões e/ou plasmídeos e ao cromossoma (Cantón e Ruiz-Garbajosa, 2011). Os integrões são constituídos por três elementos: o gene de integrase (*intI*) que codifica a enzima integrase que garante a integração dos genes; o local de recombinação do integrão com as cassetes genéticas (*attI*) e o promotor (P1) que certifica a expressão do operão (El Salabi *et al.*, 2013).

7.2.4 Transposões compostas e Sequências de Inserção

As sequências de inserção (ISs) designam-se por elementos genéticos simples capazes de se movimentar no genoma, são por isso a forma mais simples de transposição (Griffiths, 1999).

A enzima transposase (*tnpA*) é codificada na região central do transposão, o qual é flanqueado por sequências invertidas e repetidas (IRs) característica de cada IS (Griffiths, 1999).

A transposase reconhece a IR e repetições idênticas noutros locais do genoma, fazendo a inserção ou excisão destes fragmentos de DNA da localização original para um novo local de DNA, promovendo assim a transferência de genes de resistência a antibióticos (Sousa, 2006).

Um par de ISs a flaquear um segmento de DNA que geralmente abrange um ou mais genes codificando para a resistência de antibióticos designa-se por transposição composta (Poirel *et al.*, 2003). Os transposões detêm a capacidade de replicação e inserção no genoma, através do mecanismo de transposição que implica a transferência de segmentos, no cromossoma ou em plasmídeos (El Salabi *et al.*, 2013) (Figura 22).

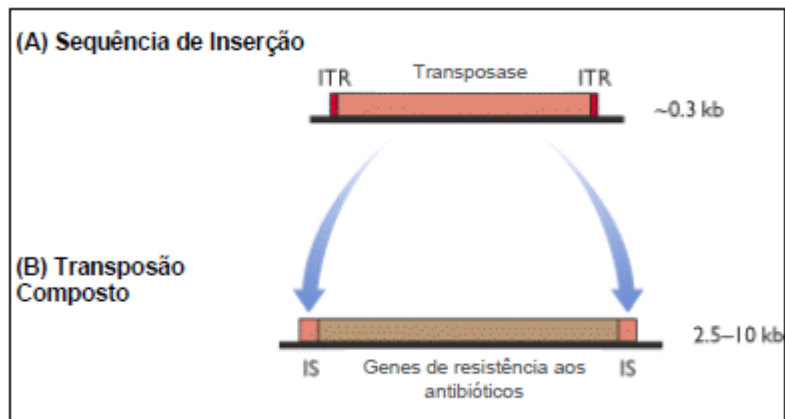


Figura 22. Estrutura de uma sequência de inserção (A) e de um Transposão (B) (adaptado de Brown, 2002).

VIII Realidade atual e perspectivas futuras da problemática da resistência aos antibióticos

Segundo a OMS a resistência aos antibióticos pode custar 10 milhões de vidas até 2050 se não forem tomadas quaisquer medidas. A OMS mostra-se cada vez mais preocupada com a existência dos denominados “supermicrobios”, microrganismos que apresentam elevada resistência aos antibióticos disponíveis para o tratamento de doenças infecciosas (OMS, 2015).

Até 2050 a resistência a antibióticos pode matar mais do que o cancro: 4,15 milhões em África, 4,73 milhões na Ásia e cerca de 400 mil nos Estados Unidos e Europa (OMS, 2015).

Os estudos revelam que o tempo gasto para tratar pacientes com infeções causadas por bactérias resistentes é muito superior ao tratamento de infeções causadas por bactérias não resistentes. Tratar um paciente com tuberculose resistente, por exemplo, custa o mesmo que tratar 100 pacientes com tuberculose não resistente (OMS, 2015).

A temática da resistência é bastante complexa, uma vez que muitos são os hábitos e protocolos que são necessários modificar para que de alguma forma se possa reprimir a crescente prevalência de estirpes multirresistentes (OMS, 2015).

A investigação de novas moléculas é um procedimento bastante dispendioso e moroso e por essa razão não se conseguem desenvolver antibióticos á celeridade pretendida. (OMS, 2015)

A melhoria das condições básicas de vida (ex: instituição de saneamento) constitui também um fator importante nas resistências aos antibióticos, uma vez que evitando a exposição aos agentes causadores promove o não-desenvolvimento da doença, evitando assim o consumo de antibióticos pela população (DGS, 2013).

A promoção de uma sensibilização agressiva é uma prioridade para que população e profissionais de saúde percebam que estamos perante um problema austero (DGS, 2013).

IX Conclusão

O aumento dramático das resistências a antibióticos, assim como as suas consequências drásticas, obrigam-nos a adotar algumas medidas no controlo da progressão e da disseminação de ESBLs em *Enterobacteriaceae*, uma vez que o aumento das multirresistências é hoje um dos maiores problemas de saúde pública (OMS, 2015).

As consequências da disseminação de genes de resistência e consequente multirresistência a antibióticos conduzem a um aumento da morbidade e mortalidade, insucesso dos tratamentos convencionais, obrigando à utilização de novas moléculas antibióticas, com o respetivo aumento dos custos (Livermore, 2003; Salgado *et al.*, 2005).

Mesmo com a elevada e exaustiva investigação na descoberta de novos antibióticos, a velocidade e escala do seu desenvolvimento são diminutas, sendo agravadas por práticas clínicas que insistem num uso abusivo de antibióticos (Mulvey e Simor, 2009; Yim, 2009).

Tendo em conta todos estes fatores torna-se indispensável a consciencialização do uso do antibiótico, assim como implementação de medidas de controlo tais como: uso racional do antibiótico (ex: limitar o uso de cefalosporinas e fluorquinolonas em humanos e animais (Faair Scientific Advisory Panel, 2002); análise da flora intestinal de pacientes hospitalizados, aquando da entrada no hospital (Bisson *et al.*, 2002); implementar medidas de isolamento de pacientes colonizados com bactérias produtoras de ESBLs; implementar métodos de deteção de clones/plasmídeos bacterianos que constituem importantes veículos de disseminação de ESBLs assim como implementar políticas de controlo de infeção pela organização de comissões de controlo da infeção com a finalidade de advertir a ocorrência e disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (Coque *et al.*, 2008, OMS, 2015).

O desenvolvimento de estudos de vigilância e evolução da resistência aos antibióticos nos hospitais e na comunidade (animais, água, esgotos, entre outros) constitui de igual forma um importante fator no combate às estirpes multirresistentes, pois permitem a compreensão da ocorrência, emergência e disseminação de ESBLs (Oteo e Campos, 2003).

Os profissionais de saúde, comunidade científica, bem como a população, deverão estar consciencializados de que as potenciais intervenções para o controlo de disseminação de estirpes multirresistentes é um problema emergente e uma vez agrupadas e intersectadas certas situações (disseminação de ESBLs entre diferentes espécies bacterianas, clones e nichos ecológicos) o controlo será simplesmente inexecutável (Coque *et al.*, 2008).

É necessário agir de imediato através da implementação de uma forma inovadora de controlo dos organismos multirresistentes (Mulvey e Simor, 2009; Coque *et al.*, 2008).

X Bibliografia

Abraham, E. P. e Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, pp. 46-837.

Andrade, S. S. *et al.* (2006). Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Instituto Oswaldo Cruz*, 101, pp. 741-748.

Allen H. K. *et al.* (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*, 8 (4), pp. 251-259.

Beceiro, A. *et al.* (2012). Antimicrobial resistance and virulence: a beneficial relationship for the microbial world? *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 30 (8), pp. 492-499.

Birgy, A. *et al.* (2012). Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 50(4), pp. 1295-1302.

Bisson, G. *et al.* (2002). Extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella species*: risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 23 (5), pp. 254-260.

Bouchillon, S. K. *et al.* (2004). Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24 (2), pp. 119-124.

Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (1), pp. 1-14.

Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.*, 14 (4), pp. 933-951.

Bradford, P. A. *et al.* (2004). Emergence of carbapenem-resistance *Klebsiella species* possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistance TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases*, 39, pp. 55-60.

Bratu, S. *et al.* (2005). Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* From Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, pp. 776-778.

Brown, T. A. (2002). Genomes. New York and London, Ed. Garland Science.

Bush, K. (2013). Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimic Resist*, (1), pp. 16–17.

Bush, K. (1989). Characterization of β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33 (3), pp. 259-263.

Bush, K. e Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobiology Agents Chemother*, 54 (3), pp. 969-976.

Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamases producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1), pp. 117-123.

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.*, 303 (6-7), pp. 298-304.

Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram-negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.*, 301(8), pp. 654-658.

Cantón, R. *et al.* (2003). Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. *Current Opinion in infectious Diseases*, 16 (A), pp. 315-325.

Cantón, R. *et al.* (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* (2) 3, pp. 110.

Cantón, R., *et al.* (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.*, 14 (1), pp. 144-153.

Cantón, R. e Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol.*, 11 (5), pp. 477-485.

Cavallo, J. D. *et al.* (2008). Recommandations 2008. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris. France.

CDC, (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. Us Department of Health and Human Services.

Coque, T. M. *et al.* (2008). Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobactereaceae* in Europe. *Euro surveillance*, 13 (47), pp. 1-11.

Cornaglia, G. *et al.* (2011). Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis.*, 11(5), pp. 381-393.

Davies, J. e Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotics resistance. 74 (3).

Di Rienzo, J. H. e cols, (1978). The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis assembly and functions. *Ann. Rev. Biochem.*, 47, pp. 481-532.

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2013). Despacho n.º 5579/2013.

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2013). Despacho n.º 2905/2013.

Drawz, S. M. e Bonomo, R. A. (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.*, 23 (1), pp. 160-201.

El Salabi, A. *et al.* (2013). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.*, 39 (2), pp. 113-122.

Essack, S. Y. (2001). The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharmaceutical research.*, 18 (10), pp.1391–1399.

Faair Scientific Advisory Panel. (2002). Policy recommendations. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (S3), pp. 76-77.

Faculty.irsc.edu. Disponível em <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFisher/images/enterobactereaceae.jpg> [consultado em 21/09/2015).

Ferreira, W. F. C. e Sousa, J. C. (2000). Microbiologia. Porto.

Fleming A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10 (3), pp. 226–236.

Forsberg, C. e col. (1971). Autolytic enzymes in growth of bacteria. *Nature*, pp. 229-272

Goossens, H. *et al.* (2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 365 (9459), pp. 579-587.

Guimarães, D. *et al.* (2010). Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents.

Griffiths, A. J. F. *et al.* (1999). Introduction to Genetic Analysis. Ed. W. H. Freeman and company.

Hancock, R. E. W. (1991). Bacterial outer membranes: evolving concepts. *ASM News*, 57, pp. 175-182.

Honore, N. *et al.* (1986). Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J*, (5) pp. 3709-3714.

Hossain, A. *et al.* (2004). Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in a *Enterobacter sp.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, pp. 4438-4440.

http://microbiologia-microuniverso.blogspot.pt/2013_03_01_archive.html [consultado em 18/09/2015].

<http://www.infoescola.com/farmacologia/penicilina/> [consultado em 8/10/2015].

<http://pharmafactz.com/medicinal-chemistry-of-beta-lactam-antibiotics/> [consultado em 15/10/2015].

Jacoby, G. A. e Medeiros, A. A. (1991). More extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 35 pp. 1697-1704.

Könönen, E. *et al.* (1998). Phylogenetic characterization and proposal of a new pigmented species to the genus *Prevotella*: *Prevotella pallens* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, pp. 47-51.

Lartigue, M. F. *et al.* (2007). Extended-Spectrum β -Lactamases of the CTX-M Type Now in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*, (8) pp. 2855-2860.

Levy, S. B. e Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.*, 10, pp. 122-129.

Levy, H. G. *et al.*, (2013). Detection, treatment, and prevention of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: recommendations from an International Working Group. *J Chemother.*, 25 (3), pp. 129-140.

Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36 (1) pp. 11-23.

Livermore, D. M. (1995). β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8 (4), pp. 557-584.

Livermore, D. M. (2012). Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med.*, 27(2), pp. 128-142.

Llarrull, L. I. *et al.* (2010). The future of the β -lactams. *Curr Opin Microbiol.* 13(5), pp. 551-557.

Lunde, C. S. *e cols* (2009). Telavancin disrupts the functional integrity of the bacterial membrane through targeted interaction with the cell wall precursor lipid II. *Ant.Ag.Chemother*, 53, pp. 3375-3383.

Machado, E. *et al.* (2009). Emergence of CTX-M-28-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal, 3rd FEMS Congress of European Microbiologists, Gothenburg.

Machado, E. *et al.* (2006). Portuguese Resistance Study Group. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1- producing *Enterobacteriaceae* strains containing the *aac(6)-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50 (9), pp. 3220-3221.

Machado, E. *et al.* (2007). High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (6), pp. 1370-1374.

Martinez-Martinez, L. (2008). Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. *Eur.Soc.Clin.Microbiol. Infect.Dis.*, 14(1), pp. 82-89.

Mcguire, H. *et al.* (2013). Heterobicyclic compounds as beta-lactamase inhibitors.

Medical Interest (2006). Report of the Second Italian Nationwide Survey. *J Clin Microbiol.*, 44, pp. 1659-1664.

Ministério da Saúde. Norma da Direção-Geral da Saúde nº004/2013 de 21 de Fevereiro. Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos. Departamento da Qualidade na Saúde.

Monteiro, J. A. (2000). Serviço de Medicina 1. Hospital Curry Cabral. Lisboa. Infecções nosocomiais. Alguns aspectos (Documentário).

Morosini, M. I. *et al.* (2006). Antibiotic co-resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobactereaceae* and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (8), pp. 2695-2699.

Mulvey, M. R. e Simor, A. E. (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *CMAJ.*, 180 (4), pp. 408-415.

Murray, P. R. *et al.* (2003). *Manual of Clinical Microbiology*.

Navon-Venezia, S. *et al.* (2006). Plasmid-mediated imipnem-hidrolizing enzyme KPC-2 among multiple Carbapenem-resistant, *Echerichia coli* vlones in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50, pp. 3098-3101.

Nicolas-Chanoine, M. H. *et al.* (2008). International emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (2), pp. 273-281.

Nikaido, H. e col. (1979). The outer membrane of Gram-negative bacteria. *Adv. Microb.Physiol*, 20, pp. 163-250.

Nikaido, H. (1992). Porins and specific channelsof bacterial outer membrane. *Mol.Microbiol*, 6, pp. 435-442.

Nikaido, H. e col. (1992). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, 49, pp. 1-32.

Nikaido (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol.Mol.Biol.*,67, pp. 593-656.

Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Anual Review of Biochemistry*.

Nordmann, P. *et al.* (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends in molecular medicine.18 (5), pp. 263–272.

Nordmann, P. *et al.* (2012). Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 50 (9), pp. 3016-3022.

Nordmann, P. *et al.* (2012). European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.*, 18 (5), pp. 432-8.

Nordmann, P. e Poirel, L. (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.. *J Antimicrob Chemother* 68 (3), pp. 487-489.

Nordmann, P. *et al.* (2009). The real threat of KPC carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9, pp. 321–331.

Novais, A. *et al.* (2010). Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance. *PLoS Pathog.*

Oteo, J. e Campos, J. (2003). Value of antibiotic resistance surveillance systems. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (3), pp. 123-5.

Organização Mundial de Saúde (OMS) (2015).

Pallecchi, L. *et al.* (2007). Rapid Dissemination and Diversity of CTX-M Extended-Spectrum-Lactamase Genes in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Children from Low-Resource Settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51, pp. 2720-2725.

Partridge, S. R. e Hall, R. M. (2005). Gene cassettes potentially encoding fosfomycin resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2), pp. 860-861.

Peirano, G. e Pitout, J. D. (2010). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. *Int J Antimicrob Agents*. 35(4), pp.316-321.

Perez, F. *et al.* (2007). The continuing challenge of ESBL'S. *Current opinion in Pharmacology*, 7 (5), pp. 459-469.

Pérez-Pérez, F. J. *et al.* (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Microbiology*, 40 (6), pp.2153-2162.

Philippon, A. *et al.* (2002). Plasmid-determined Amp-C-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (1), pp. 1-11.

Pitout, J. D. (2012). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol*.19, pp. 3-9.

Pitout, J. D. *et al.* (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*. 56(1), pp. 52-59.

Poirel, L. *et al.* (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by na *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (3), pp. 573-814.

Poirel, L. *et al.* (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D betalactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(1), pp. 24-38.

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

Salgado, C. D. *et al.* (2005). Prevention and control of antimicrobial-resistant infections in intensive care patients. *Critical Care Medicine*, 33 (10), pp. 2373-2382.

Scott, G. (2009). Antibiotic resistance. *Medicine*, 37(10), pp. 551-556.

Souha, S. *et al.* (2011). Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc.* 86(3), pp. 250-259.

Sousa, J. C. (2006). Manual de Antibióticos Antibacterianos. *Edições Universidade Fernando Pessoa*.

Stuart, R. L. *et al.* (2011). Prevalence of antimicrobial-resistant organisms in residential aged care facilities. *Med J Aust.* 195(9), pp. 530-533.

Summanem, P. *et al.* (1993). Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Belmont, CA, *Star Publishing Co.*

Tzouvelekis, L. S. *et al.* (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 25(4), pp. 682-707.

Wang, Z. *et al.* (1999). Metallo-beta-lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol*, 3(5) pp. 614-622.

Williams, J. D. (1999). β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents.* 12, pp. 3-7.

Ygitt, H. *et al.* (2001). Novel Carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45, pp. 1151-1161.

Ygitt, H. *et al.* (2003). Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 47, pp. 3881-3889.

Yim, G. (2009). Attack of the superbugs: antibiotic resistance. *The Science Creative Quarterly*, (4).

Zeng, X. e Lin, J. (2013). Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol.*, 22 (4), pp. 128.