

INÊS MATOS E SILVA

**ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E AS
“SUPERBACTÉRIAS”**

Orientadora: Professora Doutora Maria João Simões

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2017

INÊS MATOS E SILVA

**ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS E AS
“SUPERBACTÉRIAS”**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 23/03/2018 perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 55/2018, de 09 de Fevereiro de 2018, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Marisa Fonseca Nicolai

Arguente: Professora Doutora Vera Gonçalves Manageiro

Orientador: Professora Doutora Maria João Simões

Vogal: Professora Ana Mirco (Especialista ULHT)

Vogal: Professora Maria Dulce Santos (Especialista ULHT)

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2017

Without urgent, coordinated action by many stakeholders, the world is headed for a post-antibiotic era, in which common infections and minor injuries which have been treatable for decades can once again kill

Dr Keiji Fukuda

Sem a ação urgente e coordenada de múltiplas áreas, o mundo dirige-se para uma era pós-antibiótico, no qual infeções comuns e lesões menores, que antigamente eram tratadas, podem voltar a matar

Dr Keiji Fukuda

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Maria João Simões, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por toda a disponibilidade para esclarecimento de dúvidas e pelas opiniões e críticas.

Quero, ainda agradecer à equipa de profissionais de saúde dos locais onde realizei os estágios curriculares, a Farmácia Apolo 70 e o Hospital CUF Descobertas.

Por último, mas não menos importante, um obrigado a toda a minha família e amigos que estiveram presentes ao longo deste percurso académico.

Resumo

As Superbactérias são consideradas um dos maiores problemas de Saúde Pública do século XXI. As consequências do aumento destes microrganismos são sérias. A limitação das opções de tratamento de infeções, o aumento dos custos de tratamento, o aumento do período de internamento hospitalar e o risco acrescido de infeção em procedimentos médicos são algumas destas consequências.

Os antibióticos Beta-Lactâmicos são, atualmente, a classe de antibióticos mais prescrita em todo o Mundo, sendo por isso de extrema importância o conhecimento sobre os mecanismos de resistência aos mesmos. As Superbactérias resistentes aos antibióticos Beta-Lactâmicos que vão ser mencionadas são *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, família *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus*.

Para que este problema seja minimizado é essencial o conhecimento das suas causas, sendo elas o uso inapropriado de antibióticos, uso excessivo nos animais, descarte inadequado de antibióticos, falhas hospitalares, diminuição do desenvolvimento de novos antibióticos e relutância na vacinação.

Para combater este problema é necessário a implementação de medidas multissetoriais tais como, melhoria da prescrição, educação da população, implementação de sistemas de vigilância, entre outros. É fundamental um uso racional dos antibióticos e para isso é necessário a intervenção dos doentes, farmacêuticos, médicos, veterinários, agricultores, ou seja, de toda a população.

Palavras chave: Antibióticos Beta-Lactâmicos, “Superbactérias”, mecanismos de resistência, estratégias de combate e uso racional de antibióticos.

Abstract

“Superbugs” are considered one of the major problems of Public Health in the 21st century. The consequences of the increasing of this microorganism are very serious. Limiting treatment options for bacterial infections, increasing treatment costs, longer hospitalization and increased risk of infection in medical procedures are some of the consequences of this increasing.

Beta-lactam antibiotics are currently the most prescribed antibiotic class in the whole world, so it is of extreme importance the knowledge of the bacterial mechanisms responsible for resistance. The “Superbugs” that are resistance to beta-lactam antibiotic that will be mentioned in this work are *Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus*.

To minimize this problem, it is necessary to know the causes of this increase, such as inappropriate use of antibiotics, excessive use in animals, inappropriate disposal of antibiotics, hospital failures, reduced development of new antibiotics and reluctance to vaccination and as many others.

It is necessary to fight this increasing through implementation of multisectorial measures such as improving prescription methods, education of population, vigilance systems and as many others. It is crucial the rational use of antibiotics and for that it is necessary intervention of patients, pharmacists, doctors, farmers, which means the whole population.

Key words: Beta-lactam antibiotics, “Superbugs”, mechanism of resistance, strategies to combat resistance and rational use of antibiotic.

Siglas e Acrónimos

ABC: “ATP-binding Cassette”

AND: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CDC: Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

CP: Plasmídeos conjugados

CRAB: *Acinetobacter baumannii* resistente aos Carbapenemos

D-Ala-D-Ala: D-alanil-D-alanina

ERC: *Enterobacteriaceae* resistentes aos Carbapenemos

ESBL: Beta-lactamases de largo espectro

ESBL-PE: Beta-lactamases de largo espectro produzidas pela família *Enterobacteriaceae*

EUA: Estados Unidos da América

Genes int/xis: Genes necessários para integração e excisão

Genes r: Genes que conferem resistência

ICE: Elementos conjugados integrados

IMI: Beta-lactamases hidrolisadores de Imipenemo

IST: Infecção sexualmente transmissível

KDa: Kilodalton

KPC: Carbapenemases produzidas por *Klebsiella pneumoniae*

LPS: Lipopolissacarídeos

MATE: “Multidrug and toxic compound extrusion”

MFS: “Major Facilitator Superfamily”

MFP: Proteína de fusão periplasmática

MGE: Elementos genéticos móveis

NAG: N- Acetilglucosamina

NAM: Ácido N- acetilmurâmico

NMS: Não metalo carbapenemases

OM: Membrana externa

OMP: Proteínas de membrana externa

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBP: “penicillin-binding proteins”

RND: “Resistance-nodulation-division”

SME: “*Serratia marcescens* enzyme”

SMR: “Small multidrug resistance”

UDP-NAG: Uridina -difosfato N- acetil glucosamina

UDP-NAM: Uridina difosfato ácido acetilmurâmico

UV: Radiação ultravioleta

Índice

Epígrafe	i
Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Siglas e Acrónimos.....	v
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	ix
1. Introdução.....	1
1.1. A multirresistência aos antibióticos e as Superbactérias	1
1.2. As Superbactérias e o seu impacto na Saúde Pública.....	1
1.3. Situação atual.....	3
2. Bases Genéticas da resistência antimicrobiana	5
a) Mutação	5
b) Transferência horizontal de material genético.....	6
I. Conjugação	7
II. Transformação.....	9
III. Transdução	10
3. Antibióticos Beta-Lactâmicos e os mecanismos de resistência.....	12
3.1. Mecanismo de ação.....	12
3.2. A resistência bacteriana aos Beta-Lactâmicos.....	13
3.3. Mecanismos de Resistência	14
3.3.1. Diminuição da permeabilidade.....	15
3.3.2. Expulsão de moléculas através de Bombas de efluxo.....	16
3.3.3. Inativação enzimática	19
3.3.4. Modificações no alvo - PBP	24
4. Superbactérias.....	25
4.1. <i>Acinetobacter spp.</i>	25
4.1.1. Mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos.....	26
4.1.2. Tratamento de infeções por <i>Acinetobacter spp.</i>	30
4.2. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	31
4.2.1. Mecanismos de Resistência aos antibióticos Beta -Lactâmicos.....	32
4.2.2. Tratamento de infeções pela família <i>Enterobacteriaceae</i>	35
4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
4.3.1. Mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos.....	37

4.3.2.	Tratamento de infeções por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
4.4.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	40
4.4.1.	Mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos.....	41
4.4.2.	Tratamento de infeções por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43
4.5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	43
4.5.1.	Mecanismo de Resistência aos Antibiótico Beta-Lactâmicos.....	44
4.5.2.	Tratamento de infeções por <i>Staphylococos Aureus</i>	46
5.	Causas do aparecimento de Superbactérias	47
5.1.	Uso inapropriado de antibióticos	47
5.2.	Uso de antibióticos nos animais e descarte inadequado no ambiente.....	48
5.3.	Falhas Hospitalares	50
5.4.	Decréscimo do desenvolvimento de Antibióticos	51
5.5.	Relutância no uso de vacinas	51
5.6.	Ciclo de Propagação de bactérias	52
6.	Estratégias para minimizar a Resistência bacteriana.....	53
6.1.	Médicos.....	53
6.2.	Paciente e Família.....	54
6.3.	Hospitais e outros locais de prestação de cuidado de saúde	54
6.4.	Educação da População em geral.....	55
6.5.	Medidas Políticas.....	56
6.6.	Indústria Farmacêutica.....	56
6.7.	Farmacêutico.....	56
6.7.1.	Comunitário.....	56
6.7.2.	Hospitalar	57
7.	Novos antibióticos	58
8.	Futuro	59
	Terapia Antibiótica.....	59
	Terapia Não antibiótica	59
9.	Conclusão	62
10.	Bibliografia.....	63

Índice de Figuras

Figura 1- Previsão da mortalidade devido à resistência bacteriana, em 2050 (O’Neill, 2014) ..2	
Figura 2- Processos de transferência horizontal de genes: a) conjugação, b) Transformação, ..7	
Figura 3-Transferência horizontal de A- CPs e B – ICEs (Koraimann & Wagner, 2014)..... 8	
Figura 4 - A – Ciclo Lisogénico e B- Ciclo Lítico (Colavecchio, et al., 2017)..... 11	
Figura 5 - Estrutura química da Penicilina e da D-Ala-D-Ala (Zeng & Lin, 2013)..... 13	
Figura 6 -Estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativo, b) estrutura das bactérias Gram-positivo (Kumar & Varela, 2013) 15	
Figura 7 -As diferentes famílias das bombas de efluxo e em que tipo de bactéria existem (Daury <i>et al.</i> , 2016) 17	
Figura 8 - Mecanismos de resistências nas bactérias Gram-negativo: a presença de OM e de bombas de efluxo (Li <i>et al.</i> , 2015)..... 18	
Figura 9 -Número de Beta-lactamases identificadas entre 1970 e 2015 (Davies & Davies, 2010)..... 19	
Figura 10 - Percentagem de isolados que são resistentes a Carbapenemos, Fluoroquinolonas e Aminoglicosídeos-dados de 2015 (ECDC, 2016).26	
Figura 11 - Casos reportados de surtos de ERC, em 2015 (ECDC, 2015)..... 32	
Figura 12 - Percentagem de estirpes isoladas que apresentam resistência a três ou mais dos seguintes antibióticos: Piperacilina+ Tazobactamo, Ceftazidima, Fluoroquinolonas, Aminoglicosídeos e Carbapenemos, em 2014(WHO, 2014b). 37	
Figura 13 - Antibióticos eficazes aos longo dos anos em <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - SUL, Sulfonamidas; PEN- Penicilinas; TET- Tetraciclinas; CIP- Ciprofloxacina; OFX- Ofloxacina; CFM-Cefixima; CRO- Ceftriaxone; AZM - Azitromicina; DOX-Doxicilina (Unemo, 2015);41	
Figura 14 -Percentagens de MRSA na Europa em 2015(ECDC, 2016)..... 44	
Figura 15 -Cassete cromossómica de <i>Staphylococcus Aureus</i> (Hiramatsu <i>et al.</i> , 2014)..... 45	
Figura 16 - Bactérias de maior relevo e os seus diferentes reservatórios (World Health Organization, 2014)..... 49	
Figura 17 -Desenvolvimento de novos antibióticos ao longo dos anos (Ventola, 2015)51	
Figura 18 -Aparecimento e desenvolvimento de resistência aos antibióticos (RATHERA <i>et al.</i> , 2017).....52	

Índice de Tabelas

Tabela 1- Correspondência da classificação de Ambler com a de Bush-Jacoby e respectivas características das enzimas (Ghafourian, Sadeghifard, Soheili, & Sekawi, 2014).....	20
Tabela 2 -Quadro resumo das características das beta-lactamases (Munita, Arias, Unit, & Santiago, 2016).....	23
Tabela 3 -Mecanismos de resistência e proteínas envolvidas na resistência de <i>Acinetobacter baumannii</i> aos antibióticos Beta-lactâmicos (Viehman <i>et al.</i> , 2014).....	27
Tabela 4 - tabela resumo das enzimas produzidas pela família Enterobacteriaceae (Thenmozhi, Moorthy, Sureshkumar, & Suresh, 2014)	35

1. Introdução

1.1. A multirresistência aos antibióticos e as Superbactérias

A resistência bacteriana é considerada um dos maiores problemas de Saúde Pública do século XXI. Tem impacto na saúde humana, saúde animal e no desenvolvimento económico, ou seja, em toda a sociedade (Davies & Davies, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias se multiplicam e adaptam na presença dos mesmos (World Health Organization, 2015).

O termo Superbactérias aplica-se a bactérias que são resistentes a vários antibióticos, sendo que podem ser classificadas como multirresistentes, extensamente resistentes ou pan-resistentes. As bactérias multirresistentes são resistentes a pelo menos um antibiótico de três ou mais classes diferentes. As extensamente resistentes são suscetíveis apenas a uma ou duas classes de antibiótico, enquanto que as bactérias pan-resistentes apresentam resistência a todos os antibióticos de todas as classes, ou seja, não há antibióticos eficazes contra este tipo de bactérias (Magiorakos *et al.*, 2012).

As Superbactérias são bactérias que sofreram “modificações” que originam o aparecimento de mecanismos de resistência aos antibióticos. Estas “modificações” são resultantes de mutações espontâneas ou da aquisição de material genético exógeno, que codifica para os genes que conferem resistência aos antibióticos, o que permite que se tornem Superbactérias. A multirresistência aos antibióticos está associada a elevada morbidade e mortalidade devido à dificuldade do tratamento destas doenças infecciosas (Davies & Davies, 2010).

1.2. As Superbactérias e o seu impacto na Saúde Pública

Ao contrário de surtos inesperados como, por exemplo, a propagação do vírus Zika ou de Ébola, a resistência bacteriana é um processo lento. Segundo o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), cerca de dois milhões de pessoas adoecem e 23 000 morrem, por ano, devido a Superbactérias (CDC, 2013).

Estimativas internacionais, concluem que se não forem tomadas medidas mais eficazes, em 2050, cerca de 10 milhões de pessoas morrerão em todo o Mundo, sendo que na Europa este número ronda as 390 000 pessoas (figura 1). Estima-se, também, que nos próximos 35 anos, 300 milhões de pessoas morram de forma prematura devido à resistência aos antibióticos e que se perca entre 60 a 100 triliões de dólares devido à perda de produção e aos custos associados aos cuidados de saúde (O’Neill, 2014).



Figura 1- Previsão da mortalidade devido à resistência bacteriana, em 2050 (O’Neill, 2014)

A limitação das opções de tratamento de infeções bacterianas, a diminuição da eficácia dos antibióticos e o aumento dos custos dos tratamentos são as principais consequências da resistência bacteriana (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

O facto do número de Superbactérias que ameaçam a eficácia do tratamento de infeções comuns estar a aumentar é uma preocupação global. Estas aumentam o risco de infeção em procedimentos médicos como, por exemplo: cesarianas, transplantes e outras cirurgias. Cada vez há mais dificuldade em tratar infeções como pneumonia, tuberculose e gonorreia, sendo que por vezes o tratamento é impossível devido à ausência de antibióticos eficazes, o que resulta na morte dos doentes (World Health Organization, 2015).

Uma outra consequência das Superbactérias é o aumento do número de reações adversas devido ao uso de antibióticos com um espectro de ação mais alargado (European Union, 2016).

Para além do problema de Saúde Pública, a resistência bacteriana também traz custos que poderiam ser evitáveis. Isto acontece porque na maioria dos casos o tratamento tem que

ser prolongado e/ou mais caro, pois muitos dos antibióticos considerados de última linha, ou seja, os antibióticos que são utilizados quando as outras opções terapêuticas não são eficazes, são mais caros. Outros fatores que contribuem para o impacto económico são: um maior período de internamento hospitalar, maior número de consultas médicas, redução de produtividade devido a baixas médicas e o facto de alguns dos antibióticos terem que ser administrados por via intravenosa, faz com que seja necessário mais material médico e um profissional de saúde com funções, entre outras, administrativas (World Health Organization, 2015).

Os doentes que não recebem um antibiótico eficaz apresentam infeções por períodos mais longos, aumentando assim a probabilidade de transmitir bactérias resistentes a outros indivíduos (Davies & Davies, 2010). A fácil transmissão de Superbactérias leva a que novas formas de resistência possam atravessar fronteiras e assim propagarem-se facilmente entre os continentes. O facto da transmissão poder acontecer pessoa-pessoa, pessoa-animal e pessoa-ambiente, incluindo alimentos, faz com que haja um maior número de reservatórios e consequentemente maior facilidade de disseminação bacteriana (Lee, Cho, Jeong & Lee 2013).

1.3. Situação atual

Em todo o Mundo, o número de mortes devido a Superbactérias ultrapassa os 700 000, por ano, sendo que na Europa este número é de aproximadamente 25 000 pessoas (O’Neill, 2014).

O impacto económico do aumento das Superbactérias também é imenso. Na Europa o custo acrescido de cuidados de saúde e a perda de produtividade devido a infeções causadas por bactérias resistentes é de cerca 1,5 biliões de euros por ano. No entanto, apenas 25 % dos países implementaram medidas de combate as bactérias resistentes (O’Neill, 2014).

Por todas estas razões, o CDC e a OMS, publicaram listas com as bactérias multirresistentes de maior impacto em Saúde Pública. Estas foram definidas tendo em conta os seguintes fatores: incidência das infeções bacterianas associadas a bactérias multirresistentes e projeção da sua incidência a 10 anos, transmissibilidade das bactérias, impacto económico, barreiras para a prevenção, disponibilidade de antibióticos eficazes, taxa de mortalidade, impacto na comunidade, prevalência da resistência e prevenção nos hospitais e comunidade. Estas listas têm como objetivo identificar as Superbactérias de maior impacto

para que haja uma maior vigilância das mesmas a fim de evitar o aumento de estirpes resistentes e promover a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos aos quais estas sejam suscetíveis. Pois não basta tratar as infecções, é necessário diminuir o seu aparecimento e para isso a implementação de sistemas de vigilâncias é crucial (CDC, 2013)(Harbarth *et al.*, 2017).

A escolha das Superbactérias que vão ser referidas na presente monografia tem como base as listas anteriormente referidas, no entanto dada a dimensão do tema de multirresistência aos antibióticos, foi necessário restringir o âmbito desta monografia a apenas a uma classe de antibióticos a dos Beta-Lactâmicos. Esta escolha é justificada pelo facto desta classe de antibióticos ser a mais prescrita em todo o Mundo. Contudo, houve uma outra restrição, pois apenas as bactérias que apresentam um estado crítico de resistência e as pertencentes ao grupo de elevado risco de resistência vão ser mencionadas. As que estão inseridas no grupo crítico de resistência incluem bactérias que requerem ações drásticas e urgentes e que estão associadas a infecções hospitalares e de cuidados de saúde, tais como *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e a família *Enterobacteriaceae*. As bactérias que estão inseridas no grupo de elevado risco de resistência, são bactérias cujo número de estirpes resistentes tem vindo a aumentar drasticamente e que requerem a implementação de estratégias que garantam que o seu nível de resistência não cresça, estas são a causa de infecções mais comuns, sendo elas *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae* (CDC, 2013)(Harbarth *et al.*, 2017).

Para que se consiga combater o aumento do aparecimento de resistências a esta classe de antibióticos é necessário, não só conhecer os mecanismos genéticos de aquisição de resistência, mas também compreender o fenómeno de transmissão de resistência intra e inter espécies para que de seguida se possa aplicar medidas de controlo do aparecimento de resistências (Bush & Bradford, 2016).

Por todas estas razões, é necessária uma ação combativa, a fim de evitar a propagação das Superbactérias existentes e o desenvolvimento de novas resistências (Ashraf, Bais, Manir, & Niazi, 2015).

2. Bases Genéticas da resistência antimicrobiana

A resistência bacteriana pode ser um processo natural ou adquirido. A resistência natural ou intrínseca é a capacidade inata das bactérias resistirem aos antibióticos. Este tipo de resistência deve-se às características funcionais ou estruturais inatas das bactérias que se opõem à ação do antibiótico, originando assim a sua ineficácia. Este tipo de resistência é independente do uso de antibióticos (Munita, Arias, Unit, & Santiago, 2016).

No entanto, outras bactérias são resistentes devido a um processo adquirido. Estas utilizam duas estratégias genéticas para se protegerem da ação das moléculas de antibiótico: a) mutação e b) aquisição e recombinação de material genético exógeno. Quando ocorre uma mutação espontânea nos genes de uma bactéria, conseqüentemente, vai ocorrer uma transferência vertical dos genes mutados, ou seja, quando a bactéria se replica as bactérias das gerações seguintes vão apresentar estes genes mutados. Relativamente à aquisição de material genético exógeno este é um processo que resulta de uma transferência horizontal de genes. Para que esta transferência ocorra é necessário a presença de vetores que transportam material genético, tais como, plasmídeos, transposões, bacteriófagos, entre outros. Por vezes, a presença de níveis baixos de antibiótico no ambiente é a causa desta transferência de genes de uma bactéria resistente para uma que era suscetível, tornando-a assim resistente (Munita, *et al.*, 2016).

As bactérias ao adquirirem novos elementos genéticos conseguem responder a pressões seletivas e adaptar-se a novas condições ambientais (Cox & Wright, 2013).

a) Mutação

Uma mutação é uma alteração permanente no genoma. As mutações génicas, ocorrem devido a uma alteração pontual ao nível dos nucleótidos de um gene. O facto de ocorrer uma alteração na sequência de ácido desoxirribonucleico (ADN) leva a que as proteínas codificadas sejam diferentes, podendo originar assim estirpes bacterianas resistentes (Santajit & Indrawattana, 2016).

No entanto, nem todas as mutações são benéficas para as bactérias, pois algumas levam a uma diminuição da homeostase (estabilidade) celular ou à sua morte. Assim, as

bactérias que desenvolvem mutações “benéficas” nos genes envolvidos no mecanismo de ação dos antibióticos, sobrevivem quando na presença de antibiótico. Ou seja, o antibiótico permite a eliminação de bactérias que lhe são suscetíveis e a sobrevivência das bactérias resistentes, existindo assim uma seleção das estirpes resistentes (Cox & Wright, 2013).

Existem inúmeros fatores que influenciam a taxa de mutação dos genes envolvidos nos processos de resistência (gene R), sendo eles: sequências instáveis, mutações recessivas ou dominantes, baixa concentração de antibiótico ou um curto período de contato, longa distância entre a origem de replicação e os genes R, número elevado de genes R, antibióticos que atuam de forma lenta, entre outros (Brooks & Beer, 2012)(Munita *et al.*, 2016).

Uma outra particularidade é o tamanho dos genes. Se existir a mesma probabilidade em todo o gene de ocorrerem mutações, os mais longos podem ser mais mutados que os pequenos. No entanto, este não é o principal fator para o aparecimento de resistências, isto porque, não são todas as mutações no gene R que levam ao aparecimento de resistências (Brooks & Beer, 2012).

Para que haja resistência a mutação não pode ser letal para a bactéria e não pode levar a uma diminuição da sua capacidade de sobrevivência (Santajit & Indrawattana, 2016).

Existem genes que quando mutados levam ao aparecimento de resistência, tais como, os responsáveis pela síntese e posição do alvo do antibiótico, (mutações meta-estruturais) e os responsáveis pelo acesso e proteção do alvo do antibiótico, como por exemplo, os que codificam para as bombas de efluxo e canais de porinas. A resistência pode resultar da mutação de um único gene (mutações independentes) ou de mutações em vários genes (mutações cooperativas). Um outro tipo de mutação, consiste na mutação adaptativa ou induzida por stress, sendo que a taxa de mutação aumenta quando a bactéria está sob condições não favoráveis como, por exemplo, a falta de nutrientes (Brooks & Beer, 2012).

b) Transferência horizontal de material genético

A transferência horizontal de genes consiste num processo de aquisição de genes exógenos. Este é um processo de propagação de genes entre bactérias, exceto entre aquelas que têm uma relação parental. Todos os genes podem ser transferidos e não só os que causam resistência (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

As bactérias podem adquirir material genético essencialmente através de três estratégias, como podemos ver na figura 2:

- I. Conjugação: transferência direta de material genético entre bactérias;
 - II. Transformação: incorporação de material genético a partir do meio envolvente;
 - III. Transdução: transferência de material genético através de bacteriófagos
- (Burmeister, 2015).

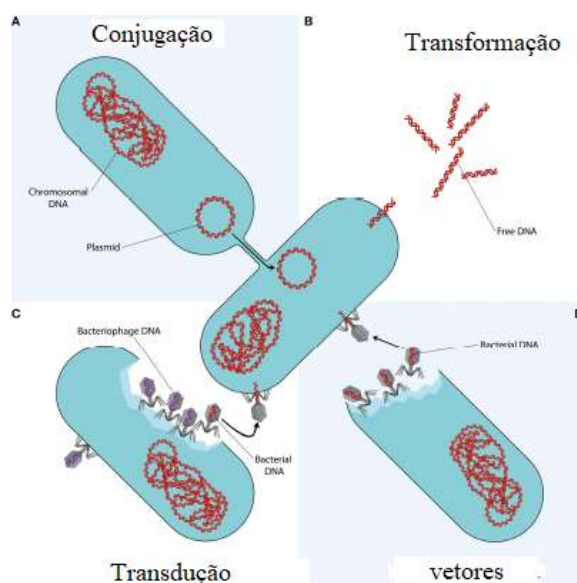


Figura 2- Processos de transferência horizontal de genes: a) conjugação, b) Transformação, Transdução, d) vetores de transferência (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

I. Conjugação

No processo de conjugação é necessário um contacto entre bactérias para que a bactéria dadora (F+) transfira material genético para a bactéria recetora (F-). O material genético é transferido através de um pili sexual e pode estar na forma de ADN em cadeia dupla ou ADN em cadeia simples. Para que ocorra a transferência de ADN em cadeia dupla são necessárias determinadas proteínas que só existem na espécie *Actinobacteria* (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Este é um processo de transferência horizontal muito eficiente que requer a presença de plasmídeos conjugados (CP) ou elementos conjugados integrados (ICE), como podemos

ver na figura 3. Para que este processo ocorra é necessário: a presença de uma bactéria dadora que contenha CP ou ICE, a expressão dos genes envolvidos no processo de transferência e a “formação” do pili sexual (Koraimann & Wagner, 2014).

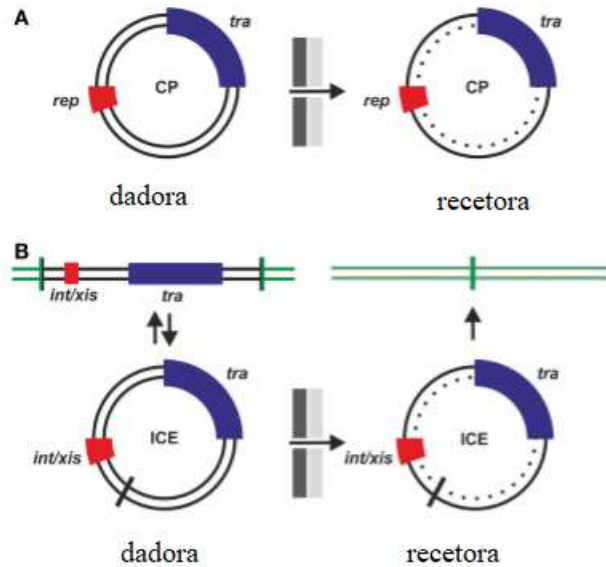


Figura 3-Transferência horizontal de A- CPs e B – ICEs (Koraimann & Wagner, 2014)

Os CP replicam-se de forma autónoma, pois apresentam todos os genes envolvidos no processo de transferência (genes *tra*) e de replicação (genes *rep*). Neste processo, depois de ocorrer a “formação” do pili sexual dá-se o corte enzimático das cadeias de ADN, havendo assim uma separação da dupla cadeia. Uma das cadeias é transferida para a bactéria recetora, enquanto que outra permanece na dadora. Na etapa seguinte, as enzimas polimerases constroem a cadeia complementar, ficando ADN em dupla cadeia em ambas as bactérias. No final, ambas as bactérias são dadoras viáveis e apresentam um plasmídeo com a mesma informação genética (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

Os ICE replicam-se como elementos integrados do cromossoma, sendo que para que este processo ocorra é necessário a expressão dos genes necessários para integração e excisão (genes *int/xis*) presentes no cromossoma. Numa fase inicial ocorre a excisão (corte) do ICE do cromossoma da bactéria, sendo que após esta excisão o ICE apresenta-se na forma de ADN em cadeia dupla, semelhante a um plasmídeo. De seguida, ocorre o processo de transferência dos ICE, que é semelhante ao dos CP, no qual apenas uma das cadeias de ADN é transferida. Depois de ocorrer esta transferência as polimerases constroem a cadeia complementar da

cadeia de ADN presente na recetora e na dadora, ficando assim o material genético outra vez semelhante a um plasmídeo em ambas. Na última fase deste processo, o ADN em cadeia dupla é integrado num local específico do cromossoma de ambas as bactérias (Koraimann & Wagner, 2014).

II. Transformação

Neste tipo de transferência horizontal de genes um fragmento de ADN livre é captado e integrado no cromossoma, sendo trocado por uma porção de ADN da bactéria recetora. Após este processo de transferência de material genético as bactérias recetoras podem expressar a informação genética agora adquirida que pode ser, por exemplo, a resistência aos antibióticos (Muschiol, Balaban, Normark, & Henriques-Normark, 2015).

No entanto, são necessárias várias condições para que este processo ocorra tais como, a presença de ADN no meio envolvente, a bactéria recetora tem que estar num estado de competência e o ADN transferido tem que ser estável. O estado de competência consiste na capacidade da bactéria em captar ADN livre do ambiente exterior, sendo que este estado pode ocorrer num período de tempo limitado e sob certas condições, como por exemplo, falta de nutrientes. A presença de antibiótico no meio não só permite a seleção de estirpes resistentes como também induz a competência nas bactérias, tornando-se assim capazes de realizar este processo. Durante esta fase são produzidas proteínas necessárias para a ligação, processamento e internalização do ADN exógeno (Engelstadter & Moradigaravand, 2013).

Após a morte e lise das bactérias ocorre uma libertação de ADN para o meio envolvente. Esta libertação inicia-se quando a bactéria morre com o auxílio de enzimas denominadas de nucleases. O ADN torna-se fragmentado e danificado, podendo persistir durante muito tempo no meio ambiente. Este pode ser modificado por processos químicos, físico e bioquímicos espontâneos, como por exemplo a oxidação e hidrólise. É importante referir que tanto o ADN em dupla cadeia como o ADN em cadeia simples podem ser introduzidos (Von Wintersdorff *et al.*, 2016).

O ADN é transportado através da parede celular por proteínas. Quando o ADN em dupla cadeia chega à membrana citoplasmática é desenrolado por uma enzima denominada de helicase. Apenas uma das cadeias entra no citosol, enquanto que a outra é degradada em nucleótidos. Com o auxílio de enzimas, o ADN exógeno é incorporado na cadeia de ADN da bactéria, através do processo de recombinação homóloga. Este processo não requer que as

bactérias pertençam à mesma estirpe, apenas que a bactéria recetora seja competente e que o seu ADN seja semelhante ao ADN exógeno. Ou seja, para que este tipo de recombinação aconteça é necessário que haja uma extensa complementaridade entre os nucleótidos presentes na cadeia de ADN endógeno e exógeno. A recombinação homóloga envolve a quebra de uma porção do ADN endógeno, onde as sequências dos nucleótidos são muito semelhantes aos da cadeia exógena e posterior junção da cadeia exógena com a endógena. Depois da recombinação ocorrer, a informação presente no ADN adquirido pode ser expressa (Muschiol *et al.*, 2015)(Holmes *et al.*, 2016).

III. Transdução

Este processo consiste na transferência de ADN entre bactérias utilizando um vírus como vetor (transportador). Os vetores neste processo de transferência consistem em bacteriófagos também denominados de fagos, ou seja, vírus que infetam bactérias. Estes são parasitas intracelulares obrigatórios, pois não se conseguem replicar sozinhos. Existem dois tipos de transdução: a especializada e a generalizada. Na especializada, os fagos apenas transportam partes específicas do cromossoma da bactéria, enquanto que na generalizada os fagos podem transportar qualquer parte do cromossoma bacteriano (Colavecchio, Cadieux, Lo, & Goodridge, 2017).

O fago é essencialmente constituído por proteínas e por ácido nucleicos (ADN em cadeia dupla ou ADN em cadeia simples ou ácido ribonucleico (ARN)). O seu genoma codifica proteínas da cápside (camada protetora) e proteínas não estruturais, necessárias para a sua “montagem”. Os fagos podem ter diferentes morfologias: poliédricos, filamentosos ou complexos (Holmes *et al.*, 2016).

Para que este processo ocorra é necessário que o fago se ligue a proteínas presentes na superfície da bactéria hospedeira. Depois de ocorrer esta ligação, o genoma entra na célula, como se fosse injetado, enquanto que a cápside permanece no espaço extracelular (Colavecchio, *et al.*, 2017).

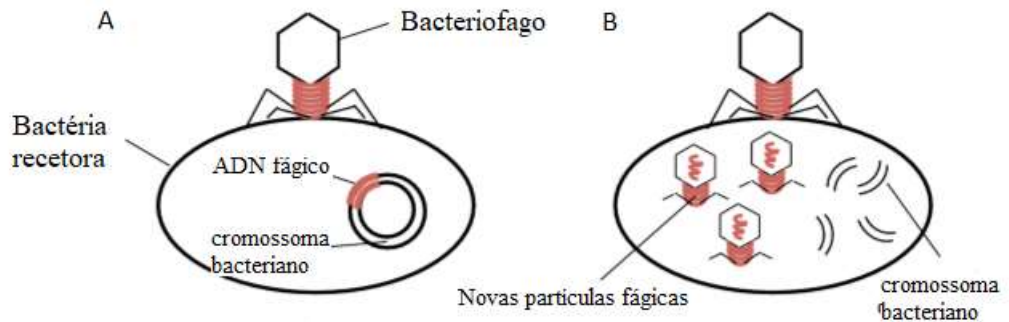


Figura 4 - A – Ciclo Lisogénico e B- Ciclo Lítico (Colavecchio, *et al.*, 2017)

Como podemos observar na figura 4, depois da injeção do material genético pode ocorrer dois tipos de ciclos, o lisogénico e o lítico. Durante o ciclo lisogénico, o ADN viral é integrado no cromossoma bacteriano, sendo que a bactéria continua o seu processo de reprodução e ciclo celular. Sob certas condições, como por exemplo, ação de luz UV, a bactéria pode iniciar o ciclo lítico. Este consiste na produção de novos fagos que são libertados através da lise da bactéria (Colavecchio *et al.*, 2017).

Na maioria dos fagos a sua montagem ocorre no citoplasma e a sua libertação leva a lise da bactéria. No entanto, nos fagos filamentosos a sua formação termina no envelope celular e são libertados sem levar à morte da bactéria. Este processo de transferência de material genético contribui para o aparecimento de Superbactérias, pois estes vetores podem transferir genes R (Von Wintersdorff *et al.*, 2016)

3. Antibióticos Beta-Lactâmicos e os mecanismos de resistência

A classe dos antibióticos Beta-Lactâmicos divide-se nas seguintes subclasses: Penicilinas e derivados, Cefalosporinas, Carbapenemos e Monobactamos. Estes apresentam em comum um anel beta-lactâmico, composto por um átomo de Azoto e três átomos de Carbono. O núcleo de cada classe (anel beta-lactâmico e anel secundário) é responsável pelo mecanismo de ação, enquanto que as cadeias laterais são responsáveis pelo espectro de ação e características farmacológicas (Lakshmi, Nusrin, Georgy, & Sreelakshmi, 2014).

3.1. Mecanismo de ação

Os antibióticos Beta-Lactâmicos apresentam como mecanismo de ação a inibição da síntese na parede celular bacteriana. A parede celular é constituída essencialmente por polímeros de peptidoglicano, sendo este é o responsável pela manutenção da forma e rigidez da parede celular. Este polímero é constituído por açúcares alternados de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) unidos por ligações β -(1,4). A síntese da parede celular ocorre em três fases. A primeira fase ocorre no citoplasma e nesta ocorre a formação de precursores essenciais para a formação do peptidoglicano, como por exemplo, a síntese de uridina difosfato ácido N-acetilmurâmico (UDP-NAM) e de uridina difosfato N-acetilglucosamina (UDP-NAG). Na segunda fase ocorre o transporte destes precursores para a membrana citoplasmática. Nesta dá-se a libertação dos nucleótidos de uridina dos precursores e ocorre a ligação do NAG ao NAM. Durante a terceira fase ocorre a terminação da formação do polímero de peptidoglicano. Cada NAM encontra-se ligado a um pequeno péptido, que difere entre espécies bacterianas. Este péptido liga-se a outro péptido através de uma “ponte” de aminoácidos, sendo esta reação catalisada pelo domínio transpeptidase das “penicillin-binding proteins” (PBP). Para que haja a formação do peptidoglicano são necessárias a atividade carboxipeptidase e transpeptidase das PBP, sendo que estas apresentam como substrato D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) (Lakshmi *et al.*, 2014). Ou seja, os antibióticos Beta-lactâmicos inibem o domínio transpeptidase das PBPs, originando a não ligação das cadeias de péptidos, ou seja, impede o “cross-link” do peptidoglicano. O anel beta-lactâmico apresenta uma elevada afinidade para com as PBPs,

ocorrendo a formação de uma ligação covalente. Como podemos ver na figura 5, a estrutura da Penicilina é muito semelhante à do substrato das PBPs, sendo que se estas enzimas estabelecerem uma ligação covalente com as moléculas de antibiótico, não vão estar “disponíveis” para se ligarem à D-Ala-D-Ala e conseqüentemente não vai ocorrer a conclusão da formação de peptidoglicano (Zeng & Lin, 2013).

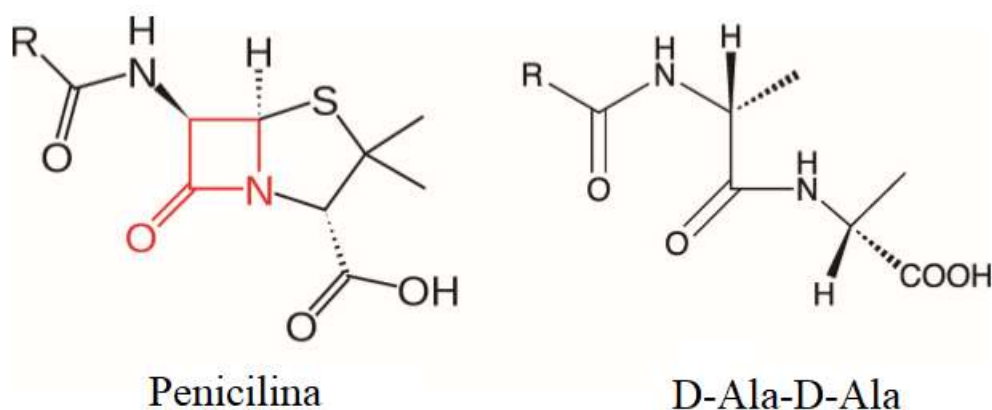


Figura 5 - Estrutura química da Penicilina e da D-Ala-D-Ala (Zeng & Lin, 2013)

Esta classe de antibiótico também consegue ativar autolisinas, ou seja, enzimas produzidas pelas bactérias que permitem a sua autodestruição. As diferentes PBP apresentam diferentes funções, por exemplo, em *Escherichia coli* a PBP2 tem como função a manutenção da forma, enquanto a PBP 3 está envolvida na divisão bacteriana (Lakshmi *et al.*, 2014).

As diferentes subclasses dos antibióticos Beta-Lactâmicos apresentam diferentes afinidades para as diversas PBP. É importante referir que a classe dos Beta-Lactâmicos apresenta uma ação bactericida, ou seja, matam as bactérias (Lakshmi *et al.*, 2014).

3.2. A resistência bacteriana aos Beta-Lactâmicos

Os Beta-Lactâmicos apresentam um largo espectro de ação, tendo ação contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. As bactérias Gram-negativo apresentam diversos mecanismos de resistência sendo o mais comum a produção de beta-lactamases. As diferentes beta-lactamases apresentam diferentes alvos de antibióticos. Beta-Lactamases de espectro

estreito são apenas ativas contra Penicilinas, enquanto que as de largo espectro podem ser ativas contra todos os Beta-Lactâmicos (Fernandes, Amador, & Prudêncio, 2013).

As Penicilinas e derivados e Cefalosporinas de 1^a e 2^a geração são antibióticos ativos contra um número significativo de bactérias, na ausência de resistência. No entanto, a resistência das bactérias a estes é bem evidente. São normalmente recomendados como terapia de 1^a linha de algumas infeções. Se ocorrer resistência bacteriana a estas classes é necessário o uso de antibiótico de espectro mais largo. As associações com inibidores das beta-lactamases, como por exemplo, o Ácido Clavulânico, têm como objetivo ultrapassar o problema da inativação dos beta-lactâmicos por estas enzimas, no entanto nem todas as beta-lactamases são inativadas na presença destes inibidores. Estas associações são úteis nos casos de infeções graves por Gram-negativo produtores de beta-lactamases, no entanto a resistência a estas associações está a aumentar. Bactérias que são resistentes a estas associações normalmente também são resistentes a Cefalosporinas de largo espectro e aos Carbapenemos (CDC, 2013).

As Cefalosporinas de largo espectro são utilizadas em casos de infeções graves por bactérias Gram-negativo. O aparecimento de resistências a esta classe começou em meio hospitalar, sendo que nos dias de hoje já se propagou para a comunidade. Quando as bactérias são resistentes a estas, a subclasse dos Carbapenemos é a única opção dentro da classe dos Beta-Lactâmicos (CDC, 2013).

Os Carbapenemos são considerados como terapia de última linha de inúmeras infeções causadas por bactérias Gram-negativo. Se as bactérias forem resistentes a esta subclasse, são resistentes a todas as outras subclasses de Beta-Lactâmicos (CDC, 2013).

3.3. Mecanismos de Resistência

A resistência das bactérias aos antibióticos Beta-Lactâmicos deve-se a quatro mecanismos principais:

1. Diminuição da permeabilidade através de alterações nos canais de porinas;
2. Expulsão das moléculas de antibiótico através de bombas de efluxo;
3. Inativação enzimática da molécula de antibiótico;
4. Alterações no alvo dos antibióticos – PBPs (Chellat, Raguž, & Riedl, 2016).

3.3.1. Diminuição da permeabilidade

Todas as classes de antibiótico apresentam um alvo intracelular, por este motivo é essencial que as moléculas de antibiótico penetrem a membrana externa, no caso das Gram-negativo e a membrana citoplasmática no caso das Gram-positivo (Kumar & Varela, 2013).

Este é um mecanismo de resistência particularmente importante nas bactérias Gram-negativo (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010).

A membrana citoplasmática das bactérias serve como uma barreira entre o citoplasma e o meio exterior. Esta estrutura apresenta-se na forma de uma bicamada lipídica, sendo por isso flexível. No entanto, as bactérias apresentam estruturas adicionais cuja principal função é retardar/impedir a entrada de substâncias tóxicas, como, por exemplo, uma membrana externa. Todavia, nem todas as bactérias apresentam membrana externa (Kumar & Varela, 2013).

Comparando os dois tipos de bactérias, as Gram-negativo são intrinsecamente menos permeáveis a inúmeras substâncias, devido à composição do seu invólucro, como podemos ver na figura 6 (Kumar & Varela, 2013).

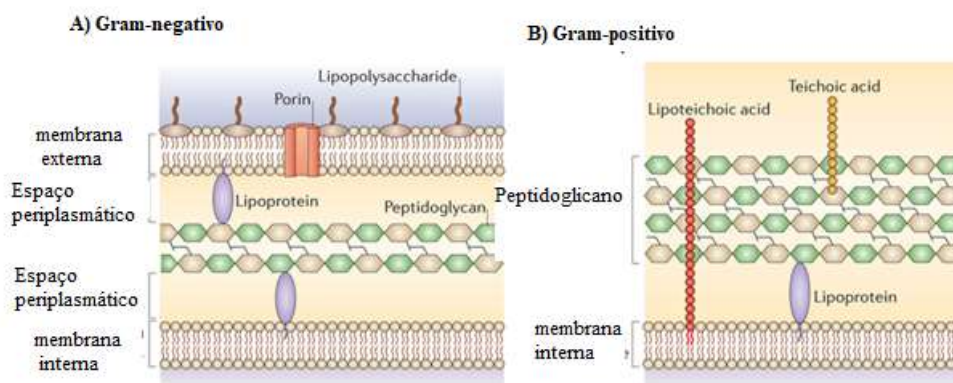


Figura 6 -Estrutura da parede celular das bactérias Gram-negativo, b) estrutura das bactérias Gram-positivo (Kumar & Varela, 2013)

Nas bactérias Gram-positivo a camada de peptidoglicano é mais espessa, sendo constituída essencialmente por polímeros de ácido teicoico e proteínas. O peptidoglicano destas bactérias permite a passagem de moléculas até 57 KDa, sendo esta a base para a suscetibilidade deste tipo de bactérias aos antibióticos. Um outro aspeto característico destas bactérias é a ausência de membrana externa (Silhavy *et al.*, 2010). As bactérias Gram-

negativo apresentam uma camada de peptidoglicano mais fina que se situa entre a membrana citoplasmática e a membrana externa (Kumar & Varela, 2013). A membrana externa permite a filtração de moléculas tóxicas e juntamente com o peptidoglicano confere estabilidade à membrana interna de forma a que esta consiga suportar as elevadas pressões osmóticas no interior da célula (Silhavy *et al.*, 2010). Esta membrana é formada por uma bicamada lipídica que, por sua vez, é constituída por fosfolípidos na parte interior, enquanto que a parte exterior apresenta glicolípidos, principalmente lipopolissacarídeos (LPS) sendo esta constituída por moléculas lipídicas (particularmente por Lípido A) ligadas covalente a polissacarídeos. Estas moléculas lipídicas contribuem para que haja uma menor fluidez da membrana. A membrana externa (OM) apresenta de forma geral dois tipos de proteínas: lipoproteína e proteínas em configuração beta. As lipoproteínas estão incorporadas na parte interna da OM, enquanto que as proteínas em configuração beta são proteínas transmembranas designadas de proteínas de membrana externa (OMP). Fazem parte deste tipo de proteínas as porinas, OmpF, entre outras. Estas proteínas transmembranas são muito importantes para o transporte de mono e dissacarídeos e de aminoácidos. A classe das porinas pode dividir-se em aquaporinas, que permitem a absorção de compostos hidrofílicos, porinas gerais e porinas específicas de determinados nutrientes. No caso dos antibióticos Beta-Lactâmicos, estes para penetrarem a membrana externa têm que recorrer ao auxílio das porinas (Silhavy *et al.*, 2010).

Assim podemos concluir, que a presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativo constitui um importante fator intrínseco de resistência a antibióticos e que mutações nos genes que codificam porinas são um fator de resistência adquirida (Kumar & Varela, 2013).

3.3.2. Expulsão de moléculas através de Bombas de efluxo

Um outro mecanismo de resistência aos antibióticos Beta-Lactâmicos consiste na “expulsão” de moléculas de antibióticos através de proteínas presentes na membrana. Estas proteínas são denominadas de bombas de efluxo e têm como função regular o meio interno da bactéria através da remoção de agentes antimicrobianos, metabolitos e outras moléculas tóxicas para a bactéria. Podem ser constituídas por um único ou diversos componentes. Apesar das bactérias apresentarem naturalmente genes que codificam para as bombas de

efluxo, situados no plasmídeo ou no cromossoma, existem genes que podem ser transferidos entre bactérias. As bombas de efluxo podem ser específicas de um substrato ou abranger diversos substratos (Daury *et al.*, 2016).

As bombas de efluxo podem ser divididas em cinco famílias, como podemos ver na figura 7, de acordo com o número de componentes, número de regiões transmembranares, fonte de energia usada e pelo tipo de moléculas que exporta (Daury *et al.*, 2016).

- A) “Major Facilitator Superfamily” (MFS);
- B) “ATP-binding Cassette” (ABC)
- C) “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE);
- D) “Small multidrug resistance” (SMR),
- E) “Resistance-nodulation-division” (RND) (Daury *et al.*, 2016).

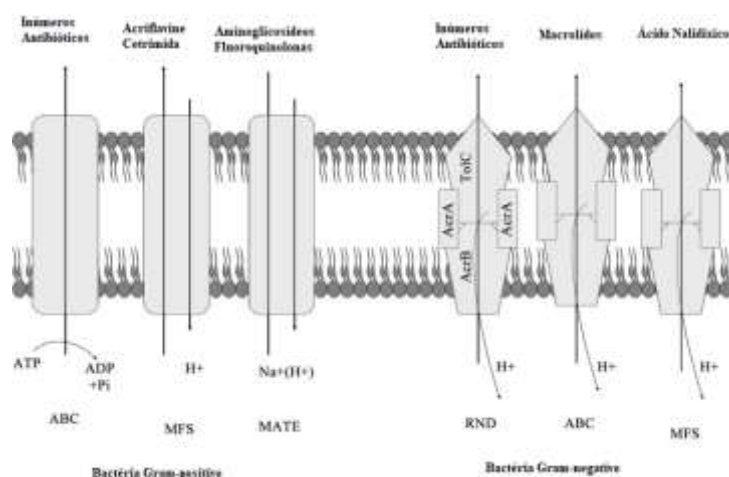


Figura 7 -As diferentes famílias das bombas de efluxo e em que tipo de bactéria existem (Daury *et al.*, 2016)

A família ABC usa como fonte de energia a hidrólise de ATP, enquanto as restantes utilizam prótons como fonte de energia (Daury *et al.*, 2016).

As famílias MFS, ABC, SMR e MATE estão presentes nas bactérias Gram-positivo e nas Gram-negativo, enquanto que a família RND apenas está presente nas Gram-negativo. A família MFS é a mais relevante nas bactérias Gram-positivo. Esta é composta por diversos tipos de subfamílias que transportam açúcares e moléculas de antibiótico (Daury *et al.*, 2016).

Dependendo das famílias de bombas de efluxo, estas podem estar presentes só na membrana interna ou podem atravessar o espaço periplasmático até à membrana externa.

Quando ocorre uma mutação nos genes que regulam a expressão das bombas de efluxo esta pode originar uma sobre expressão das mesmas e conseqüentemente o aparecimento de resistências. Quando os genes que codificam para as bombas de efluxo estão sobre expressos a bactéria apresenta um elevado nível de resistência, expulsando assim inúmeras moléculas (Sun, Deng, & Yan, 2014).

A família RND expulsa compostos biológicos e agentes antimicrobianos. Esta é composta por três elementos: o transportador RND que está situado na membrana citoplasmática, uma proteína de fusão periplasmática (MFP) e uma proteína situada na membrana externa (OMP) que tem como função a ligação da MFP à parte externa da bactéria (Li, Plésiat, & Nikaido, 2015).

Normalmente a resistência aos antibióticos não é atribuída apenas a este mecanismo de resistência, mas sim a uma combinação dos mecanismos. A resistência das bactérias Gram-negativo é atribuída a uma combinação da impermeabilidade da OM e da presença das bombas de efluxo, como podemos ver na figura 8 (Li, *et al.*, 2015).

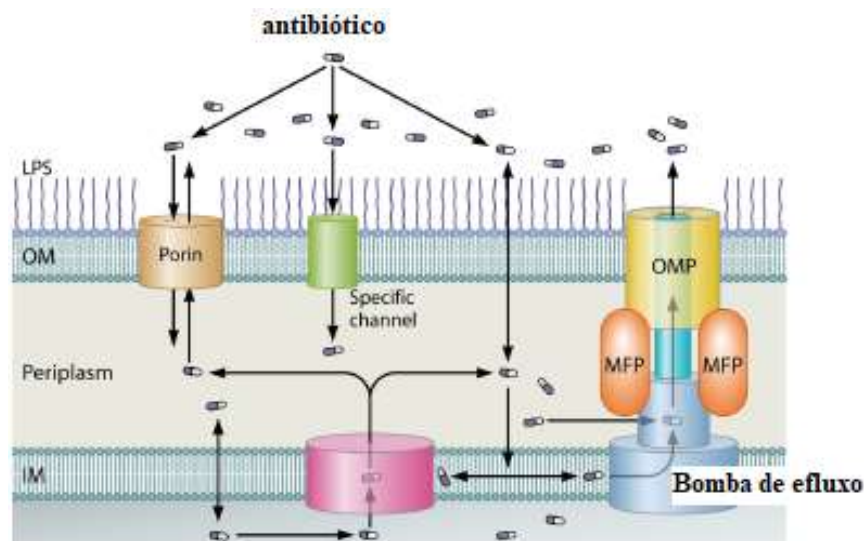


Figura 8 - Mecanismos de resistências nas bactérias Gram-negativo: a presença de OM e de bombas de efluxo (Li *et al.*, 2015)

A passagem de fármacos, nas bactérias Gram-negativo, através da OM e da membrana interna pode ocorrer através de: porinas, proteínas específicas e da região LPS. Após a entrada dos fármacos estes podem penetrar a membrana interna por difusão ou podem ser expulsas da bactéria pelas bombas de efluxo que podem apresentar um único componente

ou três componentes (a bomba de efluxo, uma proteína da membrana externa (OMP) e uma proteína de fusão periplasmática (MFP) (Daury *et al.*, 2016).

3.3.3. Inativação enzimática

A inativação enzimática é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativo aos antibióticos Beta-Lactâmicos. As beta-lactamases são enzimas que degradam o anel beta-lactâmico, através do corte da ligação amida, o que resulta na não ligação das moléculas de antibióticos às PBPs. O número conhecido das beta-lactamases tem vindo a aumentar ao longo dos anos, como podemos ver na figura 9, tornando-se assim um dos diversos mecanismos de resistência. Os genes que codificam estas enzimas são normalmente denominados de genes *bla* juntamente com o nome da enzima específica como, por exemplo, *bla-KPC*, sendo que podem estar presentes no cromossoma ou em elementos genéticos móveis (MGE). Estes genes podem ser expressos de forma constitutiva (sempre) ou indutiva (apenas quando há um sinal externo que induz a sua produção) (Munita *et al.*, 2016).

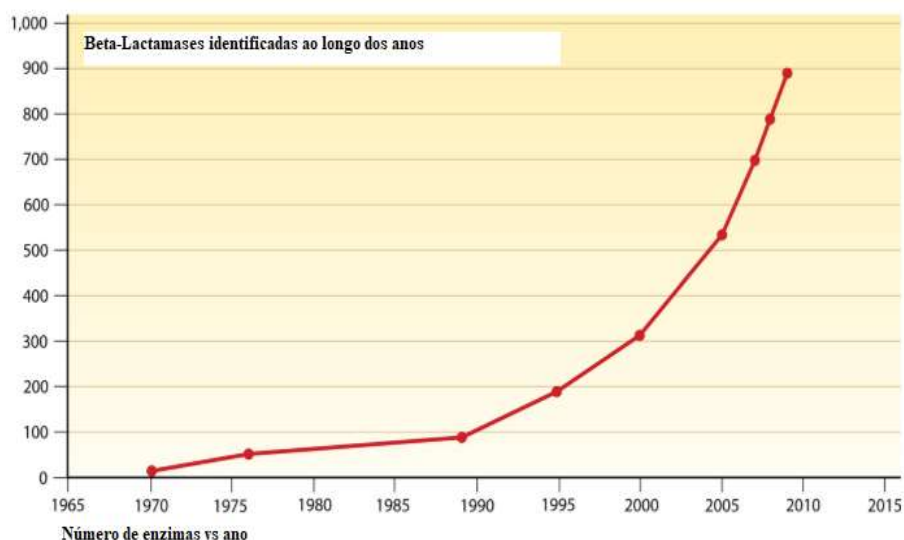


Figura 9 -Número de Beta-lactamases identificadas entre 1970 e 2015 (Davies & Davies, 2010)

Relativamente à classificação das beta-lactamases há duas formas globalmente aceites, como podemos ver na tabela 1: a classificação de Ambler que tem como base a sequência de aminoácidos dividindo-se assim em 4 grupos (A, B, C e D) e classificação de Bush-Jacoby que também divide as beta-lactamases em 4 grupos com diversos subgrupos,

tendo em consideração a sua função bioquímica baseada na especificidade do substrato (Davies & Davies, 2010).

Tabela 1- Correspondência da classificação de Ambler com a de Bush-Jacoby e respetivas características das enzimas (Ghafourian, Sadeghifard, Soheili, & Sekawi, 2014)

Classe de Ambler	Classificação de Bush Jacoby	Características das beta-lactamases	Número de enzimas
C	1	Enzimas codificadas a nível do cromossoma e dos plasmídeos de bactérias Gram-negativo	51
A	2a	Penicilinasas produzidas por estafilococos e enterococos	23
	2b	ESBL	16
	2be	ESBL	200
	2br	Beta-lactamases	24
	2c	Enzimas hidrolisadoras de Carbenicilina	31
	2f	Enzimas hidrolisadores de Carbapenemos	4
B	3	Metalo-lactamases	24
D	2d	Enzimas hidrolisadoras de Oxacilina	31

A classe **A de Ambler** corresponde ao grupo **2a, 2b, 2c, 2be, 2br, 2e e 2f** da classificação de **Bush-Jacoby** (Ghafourian, Sadeghifard, Soheili, & Sekawi, 2014).

As beta-lactamases pertencentes a esta classe apresentam um resíduo de serina no seu sítio catalítico.

Estas dividem-se nos seguintes subgrupos:

- **2a:** correspondem a penicilinasas. São produzidas principalmente por bactérias cocos Gram-positivo, como por exemplo: estafilococos e menos frequente enterococos. Apresentam um espectro de ação limitado, hidrolisando preferencialmente

Penicilinas e derivados e apresentam pouca afinidade para com Cefalosporinas, Carbapenemos e Monobactamos. Estas enzimas são inibidas pelo Tazobactamo e Ácido Clavulânico. A enzima mais representativa deste grupo é a PC1 (Ghafourian *et al.*, 2014).

- **2b**: correspondem a beta-lactamases de largo espectro. As enzimas desta classe hidrolisam Penicilinas e algumas Cefalosporinas. São inibidas pelo Ácido Clavulânico e Tazobactamo. Desta classe fazem parte enzimas como TEM-1, TEM-2, SHV-1. Dentro deste grupo existe um subgrupo, denominado de **2be** que apresenta uma atividade alargada em relação ao grupo **2b**, pois também conseguem hidrolisar Aztreonam e Ceftazidima (Ghafourian *et al.*, 2014).

- **2br**: correspondem a beta-lactamases. Hidrolisam Penicilinas e são resistentes ao Ácido Clavulânico. Enzimas como TEM-30 e SHV – 10, são exemplos deste grupo. O grupo **2ber** apresenta em espectro mais largo que **2br**, pois também hidrolisam Cefalosporinas e Monobactamos (Bush & Jacoby, 2010).

- **2c**: correspondem a penicilinases. Estas enzimas hidrolisam a Ticarcilina, Benzilpenicilina, entre outros antibióticos. São inibidas pelo Ácido Clavulânico e pelo Tazobactamo. Deste grupo fazem parte o PSE-1 e o CARB-3. O subgrupo **ce** apresenta um espectro mais largo tendo ação também contra o Cefepima (Ghafourian *et al.*, 2014).

- **2e**: correspondem a cefalosporinases. Estas enzimas conseguem hidrolisar Cefalosporinas, no entanto são inibidas pelo Tazobactamo e Ácido Clavulânico. CepA é uma das enzimas representativas deste grupo (Ghafourian *et al.*, 2014).

- **2f**: este grupo é constituído por carbapenemases, ou seja, enzimas que inibem a classe dos Carbapenemos. KPC-2, IMI-1 e SME-1 são as enzimas mais representativas deste grupo (Ghafourian *et al.*, 2014).

A Classe B de Ambler corresponde ao grupo **3 da classificação de Bush-Jacoby**.

As enzimas pertencentes a esta classe são denominadas de metalo-lactamases. Este nome deve-se à presença de um ião metálico, normalmente de zinco, como cofator. A

presença deste íon metálico é uma das diferenças desta classe para com a classe A, C e D, pois estas apresentam como cofator um resíduo de serina (Ghafourian *et al.*, 2014).

No entanto, as metalo-lactamases são inibidas pela presença de íões quelantes, como por exemplo, o EDTA (Ghafourian *et al.*, 2014).

Estas enzimas são codificadas por genes geralmente situados no cromossoma. As metalo-lactamases hidrolisam os Carbapenemos, Cefamicinas e Aztreonam (de forma menos eficaz). No entanto, não são inibidas pelo Ácido Clavulânico nem pelo Tazobactamo. Existem 10 tipos de enzimas pertencentes a esta classe, no entanto aquelas que apresentam uma maior representação Mundial são as enzimas IMP, VIM e NDM. As IMP são produzidas por *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, e *Acinetobacter spp* entre outras espécies. As enzimas VIM foram descobertas em Verona, Itália, daí o seu nome “Verona metalo beta lactamase codificada por integrões”, produzidas por exemplo, por *Pseudomonas aeruginosa*. Mais recentemente, foi descoberta uma nova classe NDM (New Dwlhi metalo beta-lactamase) produzidas pela espécie *Klebsiella pneumoniae* (Bush & Jacoby, 2010).

A classe C de Ambler corresponde ao grupo **1 da classificação de Bush-Jacoby**.

Dentro desta classe, destaca-se as cefalosporinases. São eficazes contra Penicilinas e Cefalosporinas, no entanto são mais ativas nas Cefalosporinas do que na Benzilpenicilina. Não são inibidas pelo Ácido Clavulânico. São normalmente codificadas no cromossoma pelo gene *blaAmpC*, mas também podem ser codificadas pelos plasmídeos. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta este gene no cromossoma, com baixa expressão, no entanto há um sobre expressão deste quando se encontra na presença de alguns Beta Lactâmicos, como por exemplo Ampicilina, Meropenemo e Amoxicilina em associação com o Ácido Clavulânico. Existe um novo subgrupo denominada de **1e**, no qual se inserem enzimas de largo espectro que apresentam uma melhor atividade contra Ceftazidima (Ghafourian *et al.*, 2014).

A Classe D de Ambler corresponde ao grupo **2d, 2de e 2df da classificação de Bush-Jacoby**.

As enzimas pertencentes a esta classe são denominadas de oxacilinasas (OXA). As diferenças significativas destas enzimas para com a classe A é o facto de hidrolisarem a penicilina Oxacilina e de serem pouco inibidas pelo Ácido Clavulânico. Existem diversos tipos de OXA, que são agrupadas tendo em conta os seus aminoácidos. Os genes que codificam estas enzimas podem ser encontrados no cromossoma e a nível dos plasmídeos de diversas bactérias. Algumas enzimas pertencentes a este grupo são eficazes contra poucos antibióticos, apresentando assim um espectro limitado, sendo apenas eficazes contra a Penicilina e Cefalosporinas de 1ª geração. Enquanto outras, tem um espectro mais alargado, sendo eficazes contra Cefalosporinas de ultima geração e contra Carbapenemos. A classe D é produzida maioritariamente na bactéria *Acinetobacter baumannii*, no entanto também pode ser produzida por outras bactérias, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A enzimas que pertencem ao grupo **2d** são enzimas que conseguem hidrolisar Cloxacilina (não comercializada em Portugal). Enquanto que as enzimas do subgrupo **2de** apresentam um espectro alargado, no entanto não conseguem hidrolisar Carbapenemos. O subgrupo **2df** consegue hidrolisar Carbapenemos e são frequentemente produzidas por *Acinetobacter baumannii* (Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi, & Kamal, 2015).

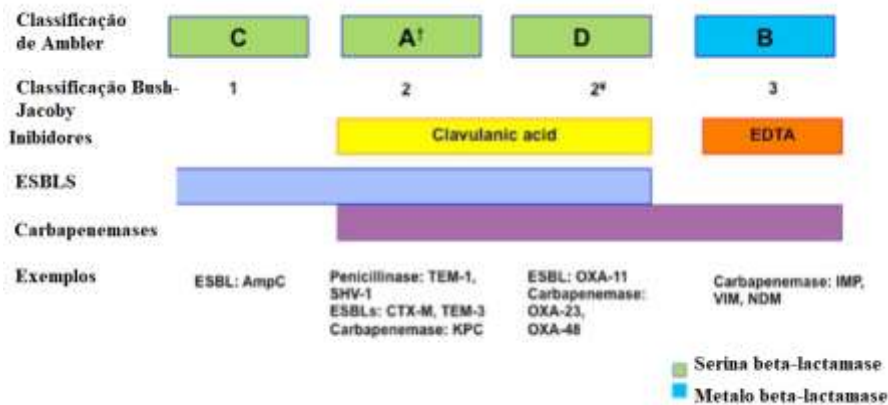


Tabela 2 -Quadro resumo das características das beta-lactamases (Munita, Arias, Unit, & Santiago, 2016).

3.3.4. Modificações no alvo - PBP

Este é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-positivo à classe dos Beta-Lactâmicos. As “modificações” do alvo destes antibióticos podem ocorrer devido:

1. Mutações pontuais nos genes que codificam para a proteína alvo;
2. Substituição ou desvio do alvo original (Munita, *et al.*, 2016).

Mutações pontuais

Mutações espontâneas nos genes que codificam as PBP podem originar uma diminuição da afinidade destas enzimas para com a molécula de antibiótico e, conseqüentemente, a diminuição da eficácia destes antibióticos (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2014).

Por outro lado, mutações em determinados genes podem levar a uma sobre expressão das PBP, no que resulta num maior número de enzimas face a quantidade de antibiótico. Deste tipo de mutação resultam PBPs que não são inativas, o que leva à continuação da formação de peptidoglicano (Blair, *et al.*, 2014).

Substituição completa do alvo

Esta estratégia bacteriana consiste na capacidade de a bactéria desenvolver novos alvos dos antibióticos que realizam as mesmas funções que o alvo original, mas que não são inibidas pelas moléculas de antibiótico. O exemplo mais significativo é a resistência à meticilina por *Staphylococcus aureus* devido à aquisição de um gene exógeno que codifica para outras PBPs. Este mecanismo vai ser abordado com mais detalhe ao longo desta monografia (Blair *et al.*, 2014).

4. Superbactérias

As “Superbactérias” mais frequentes são as Gram-negativo, sendo apontes como a causa mais frequente de infeções graves relacionadas com a prestação de cuidados de saúde. Também, as bactérias Gram-positivo são consideradas um problema, mas não na extensão das Gram-negativo. Bactérias como *Acinetobacter spp.*, as da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus* apresentam resistências aos Antibióticos Beta-Lactâmicos que são consideradas preocupantes. Como tal, é necessário o conhecimento do mecanismos de resistência para que se consiga solucionar este problema (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

4.1. *Acinetobacter spp.*

As espécies *Acinetobacter* são reconhecidas como uma das causas mais relevantes de infeções adquiridas nos hospitais. O género *Acinetobacter* é constituído por várias espécies, no entanto, *Acinetobacter baumannii* é considerada a espécie com mais relevância clínica. *Acinetobacter baumannii* pertence ao grupo dos organismos ESKAPE, isto é, um grupo de bactérias clinicamente relevantes que estão associadas a infeções nos cuidados de saúde. Deste grupo fazem parte as seguintes bactérias: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter spp.* *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter sp.* (Lee *et al.*, 2017).

Esta bactéria é capaz de acumular diversos mecanismos de resistência, originando assim o aparecimento de estirpes multirresistentes, sendo que 25% a 50% das estirpes de *Acinetobacter baumannii* isoladas em Portugal são consideradas multirresistentes, como podemos ver na figura 10 (ECDC, 2016).

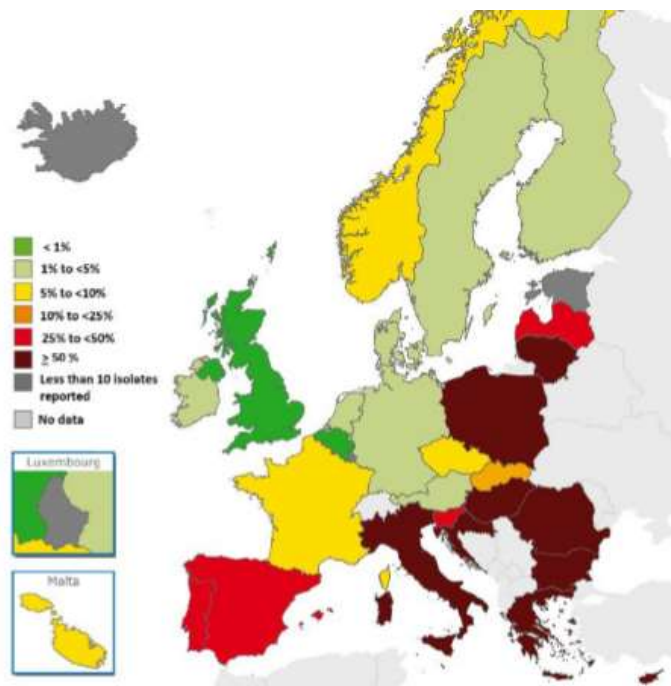


Figura 10 - Percentagem de isolados que são resistentes a Carbapenemos, Fluoroquinolonas e Aminoglicosídeos-dados de 2015 (ECDC, 2016).

Esta espécie causa, por ano, 7300 infeções, sendo que cerca de 500 resultam na morte do doente (CDC, 2013). As infeções ocorrem em locais que apresentam um grande conteúdo líquido, sendo assim apontadas como a causa de pneumonias adquiridas no hospital, pneumonias adquiridas na comunidade, bacteriémia, infeções urinárias, meningite, entre outras. Mais de 50% dos indivíduos com bacteriémia causada por esta bactéria morrem (Michalopoulos & Falagas, 2010).

4.1.1. Mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos

Quando se compara o involucro celular de *Acinetobacter baumannii* com o de outras bactérias conclui-se que este apresenta menos canais de porinas o que origina uma diminuição da entrada de moléculas de antibiótico. Uma outra particularidade sobre o seu involucro é que as características deste muda consoante o ambiente, aumentando a sua espessura quando a bactéria é colocada em ambientes mais hostis, fazendo assim com que fique mais protegida do exterior (Davies & Davies, 2010).

Resistência aos Carbapenemos

Nos últimos anos, os Carbapenemos eram considerados a classe de antibióticos mais eficaz para o tratamento de *Acinetobacter baumannii* multirresistente. No entanto, *Acinetobacter baumannii* resistente aos Carbapenemos (CRAB) têm vindo a aumentar, sendo normalmente resistente a todos os antibióticos exceto Colistina e Tigeciclina (Viehman, Nguyen, & Doi, 2014).

Os mecanismos de resistência aos Carbapenemos consistem na a) produção de carbapenemases, b) expulsão de moléculas de antibiótico através das bombas de efluxo c) reduzida permeabilidade da membrana externa e d) modificações nas PBPs (Tabela 3).

Tabela 3 -Mecanismos de resistência e proteínas envolvidas na resistência de *Acinetobacter baumannii* aos antibióticos Beta-lactâmicos (Viehman *et al.*, 2014).

Mecanismo de Resistência	Classes/Famílias	Proteína
Beta-Lactamases	Classe A	TEM-1; TEM-92; GES-1; GES-5; GES-11; GES-12; GES-14; PER-1; PER-2; PER-7; CTX-M-2; CTX-M-15; SCO-1; VEB-1
	Classe B	IMP-1; IMP-2; IMP-4; IMP-5; IMP-6; IMP-8; IMP-11; IMP-19; IMP-24 VIM-1; VIM-2; VIM-3; VIM-4; VIM-11
	Classe C	AmpC
	Classe D	OXA-21; OXA-128; OXA-37; OXA-23; OXA-51; OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-143, OXA-235
Bombas de efluxo	ABC	AdeFGH; AdeIJK
	MFS	TetA; TetB; CmlA; CraA; AmvA; AbaF
	MATE	AbeM
Defeitos na Permeabilidade	Porinas	OmpA CarO
Alteração do Alvo	Modificações nas PBPs	PBP2

a) Produção de Carbapenemases

Acinetobacter baumannii produz de forma natural e em pouca quantidade carbapenemases denominadas de OXA-51 e cefalosporinas do tipo AmpC. Estas enzimas inativam antibióticos como Aminopenicilinas, Cefalosporinas de 1^a e 2^a geração e Aztreonam, mas não Carbapenemos. No entanto, quando *Acinetobacter baumannii* adquire um gene promotor exógeno, ou seja, um gene que controla a expressão de outros, como por exemplo os genes *ISAbal* ou *ISAbal9* as carbapenemases vão ser produzidas em maior quantidade, originando assim a resistência a esta classe. Contudo, estes genes têm que ser inseridos num local específico, isto é, a montante do gene *bla*- OXA-51 na sequência de ADN (Ruppé, Woerther, & Barbier, 2015).

Para além dos genes anteriormente referidos, existem outros que podem ser adquiridos, tais como os que codificam para as seguintes enzimas OXA-23, -40, -58, -143 e -235, sendo a enzima OXA-23 a causa mais frequente de resistência aos Carbapenemos. As carbapenemases do grupo OXA conferem resistência aos Carbapenemos, mas não a Cefalosporinas. *Acinetobacter baumannii* também pode adquirir genes que codificam enzimas que não pertencem ao grupo OXA, nomeadamente as NDM, em menor quantidade IMP e VIM e ainda mais raro KPC e GES (Viehman *et al.*, 2014).

b) Bombas de efluxo

As bombas de efluxo presentes em *Acinetobacter baumannii* conferem resistência aos Carbapenemos. A subfamília AdeABC pertencente à família RND é a que está mais envolvida na multirresistência desta bactéria, apresentando-se em 80% dos casos de resistência (Rumbo *et al.*, 2013). AdeABC é regulada pelo gene *adeRS*, sendo que uma mutação ou uma inserção do gene *Isabal*, pode levar a uma sobre expressão das bombas de efluxo. Mutações em diversos genes que codificam para a bomba de efluxo podem originar uma sobre expressão destas proteínas, tais como: mutações no gene *AbeM* pode levar a uma sobre expressão da família MATE, que está envolvida na expulsão de moléculas de antibiótico (Viehman *et al.*, 2014).

c) Canais de porinas mutados

Acinetobacter baumannii possui canais de porinas denominados de CarO. Estes consistem em canais de influxo, ou seja, canais que permitem a entrada de moléculas. Fármacos como o Imipenemo utiliza este canal para penetrar a membrana celular. No entanto, quando ocorre a inserção de genes como *ISAbal0* ou *ISAbal825* a montante do gene que codifica esta porina, este canal não se expressa, no que resulta na não passagem deste fármaco para o interior da membrana celular (Howard, Donoghue, Feeney, & Sleator, 2012).

d) PBPs mutadas

Mutações nos genes que codificam PBPs originam o aparecimento de resistência a esta classe de fármacos. *Acinetobacter baumannii* apresenta sete PBPs, sendo elas 1a, 1c, 2, 3, 4, 4b e 5. Quando os genes que codificam estas enzimas são mutados pode resultar numa diminuição da afinidade destas enzimas para com a molécula de antibiótico, o que origina uma diminuição de eficácia do medicamento (Howard *et al.*, 2012).

Resistência a Cefalosporinas

Acinetobacter baumannii produz de forma natural beta-lactamases, denominadas de ADC que significa de “cefalosporinas derivadas de *Acinetobacter*”. Apesar desta produção ser natural, quando os genes *ISAbal1* ou *ISAbal125* são inseridos a montante do gene que codifica as enzimas AmpC na sequência de ADN, origina uma hiperprodução destas beta-lactamases. Estas beta-lactamases não são eficazes no Cefepima, no entanto quando se trata de ADC de largo espectro estas são eficazes em toda a classe de Cefalosporinas (Almasaudi, 2016).

Acinetobacter baumannii também produz ESBL, sendo a do tipo PER a mais encontrada nestas bactérias (Almasaudi, 2016).

Resistência ao Sulbactamo

A ação do Sulbactamo em *Acinetobacter baumannii* consiste na sua ligação à PBP2, impedindo assim a formação de peptidoglicano. Mutações nos genes que codificam esta PBP podem originar um decréscimo da produção desta enzima ou a uma mudança na sua estrutura impedindo a ligação do antibiótico. Um outro mecanismo de resistência ao Sulbactamo é a produção de enzimas TEM-1, que inativam este fármaco (Viehman *et al.*, 2014).

4.1.2. Tratamento de infeções por *Acinetobacter spp.*

Terapêutica de primeira e segunda linha

Acinetobacter spp. quando suscetível, apresenta como tratamento Cefalosporinas como Ceftazidima ou Cefepima ou um Beta-Lactâmico em associação com um inibidor das beta-lactamases por exemplo, Sulbactamo. Uma outra alternativa são Carbapenemos, como Meropenemo e Imipenemo. Se estes falharem podem recorrer-se a antibióticos como Tobramicina (Aminoglicosídeo) e Quinolonas como Ciprofloxacina (Fishbain & Peleg, 2010).

Terapêutica alternativa

Acinetobacter baumannii é definida como multirresistente quando não é suscetível a três ou mais dos seguintes dos seguintes antibióticos: Aminoglicosídeos, Ampicilina-Sulbactamo, Carbapenemos, Cefalosporina e Fluoroquinolonas. Como terapia alternativa aos antibióticos acima indicados, as opções são limitadas. Quando se trata de *Acinetobacter* multirresistente, antibióticos como Polimixinas, Minociclina e Tigeciclina podem ser utilizados. Sendo as Polimixinas (Polimixinas B e Polimixinas E ou Colistina) os antibióticos mais utilizados quando se trata de *Acinetobacter* multirresistentes (Fishbain & Peleg, 2010).

4.2. Família *Enterobacteriaceae*

A resistência aos antibióticos das bactérias da família *Enterobacteriaceae* tem vindo a aumentar ao longo dos anos, principalmente aos antibióticos Beta-Lactâmicos. A esta família pertence *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Providentia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, entre outros. Algumas destas bactérias são consideradas comensais no nosso intestino, tais como a *Escherichia coli* e *Enterobacter spp.* No entanto, quando presentes no trato urinário, vias respiratórias, feridas e sangue originam doença. Algumas espécies desta família, tais como, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* entre outras são consideradas patogénicas sempre que presentes no organismo (Thenmozhi, Moorthy, Sureshkumar, & Suresh, 2014).

Infeções causadas por estas bactérias ocorrem, normalmente, em doentes imunocomprometidos, principalmente em doentes em ambiente hospitalar, e estão frequentemente associadas ao uso de dispositivos como ventiladores e cateteres, mas também à toma prolongada de antibióticos. É muito preocupante a resistência destas bactérias à classe dos Carbapenemos, sendo denominadas por Enterobacteriaceae Resistentes aos Carbapenemos (ERC) (Thenmozhi *et al.*, 2014)

ERC constituem um subgrupo desta grande família que é resistente aos Carbapenemos, sendo que existem diversas variantes que apresentam diferentes perfis de resistência e diferentes graus de transmissão. Em Portugal, existem surtos hospitalares esporádicos de ERC, como podemos ver na figura 11.

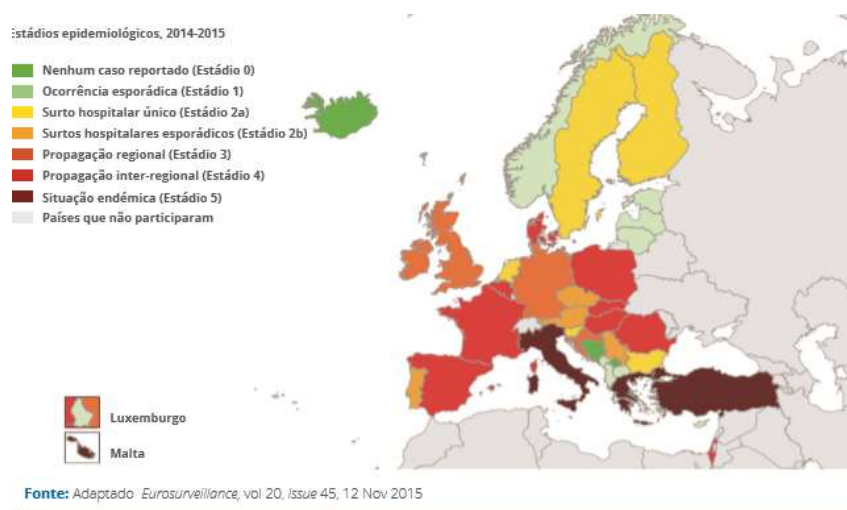


Figura 11 - Casos reportados de surtos de ERC, em 2015 (ECDC, 2015)

4.2.1. Mecanismos de Resistência aos antibióticos Beta -Lactâmicos

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* apresentam diversos mecanismos de resistência, dos quais se destacam a modificação das moléculas de antibiótico através da produção de beta-lactamases, diminuição da permeabilidade devido a mutações nos genes que codificam as porinas e mecanismo de expulsão de fármacos através das bombas de efluxo (Kocsis & Szabó, 2013).

Apesar desta família apresentar vários mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos, o principal consiste na produção de beta-lactamases. *Bactérias* da família *Enterobacteriaceae* produzem inúmeras enzimas, umas de forma natural e outras devido à aquisição de genes (Ruppé *et al.*, 2015).

Resistência à Penicilina e Cefalosporinas de 1ª Geração

Bactérias como *Enterobacter sp.*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Serratia arcescens* e *Providencia sp.* produzem cefalosporinases do tipo AmpC de forma indutível, sendo estas codificadas a nível do cromossoma. Estas enzimas são produzidas quando estas bactérias estão na presença de antibióticos como Ácido Clavulânico, Amoxicilina, Cefoxitina e Cefalosporinas de 1ª Geração. Este é um fenómeno de resistência intrínseca. A subclasse dos Carbapenemos também é indutora destas enzimas, contudo esta não é hidrolisada (Kocsis & Szabó, 2013). No entanto, se ocorrerem mutações espontâneas

neste sistema de indução e se essa mutação originar uma hiperprodução da enzima AmpC, estas bactérias tornam-se resistentes não só a Penicilinas e Cefalosporinas de 1ª Geração, como também a Cefalosporina de 3ª Geração (Ruppé *et al.*, 2015).

A maioria das estirpes pertencentes a esta família apresentam mecanismos de resistência intrínseca. Por exemplo, *Escherichia coli* apresenta, a nível do cromossoma, genes que codificam a enzima AmpC, no entanto este gene é pouco expresso e não é regulado pelo sistema de indução. Também espécies como *Klebsiella sp.* e *Citrobacter koseri* produzem beta-lactamases pertencentes à classe A de Ambler, sendo estas codificadas a nível do cromossoma (Ruppé *et al.*, 2015).

Todavia, a maioria destas espécies apresentam os dois tipos de resistência. *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.* e *Escherichia coli* apresentam também mecanismos de resistência adquirida, devido à transferência horizontal de material genético, principalmente de plasmídeos (Kocsis & Szabó, 2013).

Cerca de 5-10% desta família é considerada “ESBL-producing *Enterobacteriaceae*” (ESBL-PE), ou seja, produz enzimas de largo espectro o que lhes confere resistente à maioria dos antibióticos Beta-Lactâmicos, com exceção de Cefoxitina e Carbapenemos. Outras enzimas produzidas por espécies desta família são CTX-M e OXA, o que também confere resistência a estas subclasse de antibióticos (Kocsis & Szabó, 2013).

Atualmente, são utilizados inibidores das beta-lactamases em associação com Beta-Lactâmicos para o tratamento de infeções por ESBL-PE, as associações mais comuns são: Amoxicilina-Ácido Clavulânico, Ticarcilina-Ácido Clavulânico e Piperacilina-Tazobactamo. No entanto, Piperacilina em associação com Tazobactamo é a associação mais eficaz a fim de evitar o uso de Carbapenemos, visto que a resistência a esta classe está a aumentar (Kocsis & Szabó, 2013).

Resistência a Cefalosporina de 2ª, 3ª e 4ª Geração

Cerca de 50 a 60% das espécies da família *Enterobacteriaceae* produzem em excesso a enzima AmpC, o que lhes confere resistência a Cefalosporinas de 3ª Geração. Estes antibióticos também são suscetíveis de sofrer hidrólise pelas enzimas TEM, SHV e CTX-M de largo espectro produzidas por esta família de bactérias. Estas beta-lactamases são atualmente codificadas a nível do cromossoma pelo gene *blaAmpC*, tendo sido capturadas por

MGE. Um exemplo deste caso é a enzima CMY-2 da família AmpC produzida por *Citrobacter freundii* (Thenmozhi *et al.*, 2014).

O tratamento de infecções causadas por bactérias que produzem enzimas hidrolisadoras de Cefalosporinas consiste em Carbapenemos, o que levou ao aumento desta última classe e conseqüentemente ao aumento de resistências (Thenmozhi *et al.*, 2014).

Resistência aos Carbapenemos

As carbapenemases são enzimas de largo espectro. Um exemplo destas são as KPC, ou seja, “*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*” que é codificada a nível dos plasmídeos de *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, bactérias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, e *Citrobacter* também podem produzir este tipo de carbapenemases. KPC é ativa contra Cefalosporinas de largo espectro, Aztreonam e Carbapenemos (Chavda *et al.*, 2016).

Klebsiella pneumoniae para além de produzir KPC também produz VIM, sendo estas duas enzimas a causa de resistências e a origem de surtos hospitalares. *Escherichia coli* também produz as enzimas NDM e OXA-48. A enzima OXA-48 consegue hidrolisar Penicilinas, Carbapenemos, mas não Cefalosporinas de 3ª Geração (Chavda *et al.*, 2016).

Esta família de bactéria também produz IMI (beta-lactamases hidrolisadores de Imipenemo), NMS (não metalo carbapenemases) e SME (*Serratia marcescens* enzima). Estas enzimas têm um espectro de ação contra as Penicilinas, algumas Cefalosporinas, Aztreonam e Carbapenemos (Chavda *et al.*, 2016).

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes a Carbapenemos (CRE) são, atualmente, consideradas um problema de Saúde Pública, pois estão associadas a elevados níveis de mortalidade principalmente devido ao atraso de administração de antibióticos eficazes e à falta de opções terapêuticas eficazes. CRE são responsáveis pela morte de 30%-75% dos doentes infetados (Chavda *et al.*, 2016).

Tabela 4 - tabela resumo das enzimas produzidas pela família *Enterobacteriaceae* (Thenmozhi, Moorthy, Sureshkumar, & Suresh, 2014)

<i>Classificação de Bush-Jacoby</i>	<i>Classificação de Ambler</i>	<i>Substrato</i>	<i>Inibidor</i>	<i>Enzimas representativas</i>
<i>1</i>	C	Cefalosporinas	Nenhum	AmpC
<i>2b</i>	A	Penicilinas, Cefalosporinas de 1 ^a Geração	Inibidores de beta-lactamases	TEM-1; TEM-2; TEM-13; SHV-13
<i>2be</i>	A	Cefalosporinas de largo espectro e Aztreonam	Inibidores de beta-lactamases	TEM -3; SHV-2; PER; VEB
<i>2d</i>	D	Cloxacilina	Inibidores de beta-lactamases	OXA-1; OXA-10;
<i>2de</i>	D	Cefalosporinas de largo espectro	Inibidores de beta-lactamases	OXA-11; OXA-15;
<i>2df</i>	D	Carbapenemos	Inibidores de beta-lactamases	OXA-23; OXA-48
<i>2f</i>	A	Carbapenemos	Inibidores de beta-lactamases	KPC; IMI; SME; NMC
<i>3a</i>	B	Carbapenemos	EDTA	MBL

4.2.2. Tratamento de infecções pela família *Enterobacteriaceae*

Terapêutica de primeira e segunda linha

Quando suscetíveis, o tratamento consiste em Penicilinas e Cefalosporinas, no entanto estes antibióticos já não são eficazes contra um número significativo de bactérias desta família (Robles *et al.*, 2014).

As bactérias produtoras de ESBLs, são resistentes a Penicilinas e Cefalosporinas, o que levou ao aumento do consumo de Carbapenemos. Este aumento de consumo levou a que houvesse uma pressão seletiva, facilitando assim a propagação de ERC. Esta família de bactérias tem conseguido adquirir mecanismos de resistência para as opções terapêuticas aplicadas, por esta razão as opções são escassas (Robles, *et al.*, 2014).

Terapêutica alternativa

Atualmente, a associação Ceftazidima -Avibactamo está a ser utilizada em infeções intra-abdominais complicadas, exceto em estirpes produtoras de metalo-lactamases. As opções terapêuticas para ERC consiste em Colistina e Tigeciclina. No entanto, estes antibióticos apresentam inúmeros efeitos adversos e já estão a ser reportados casos de resistência, principalmente à Colistina. Estirpes resistentes à Colistina já foram apontadas como sendo a causa de surtos hospitalares. O que significa que já foram reportadas estirpes resistentes a todos os antibióticos, ou seja, já foram reportadas estirpes pan-resistentes. (Robles, *et al.*, 2014).

4.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é classificada como um agente ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*), sendo assim considerada como uma das seis bactérias que são a causa mais frequente de infeções nosocomiais (ECDC, 2015). Esta espécie bacteriana está associada a infeções graves adquiridas no hospital apresentando uma taxa de mortalidade elevada, especialmente em doentes imunocomprometidos. Algumas estirpes são resistentes à maioria dos antibióticos, incluindo aos Aminoglicosídeos, Cefalosporinas, Carbapenemos e Fluoroquinolonas, como podemos observar na figura 12 (WHO, 2014b).

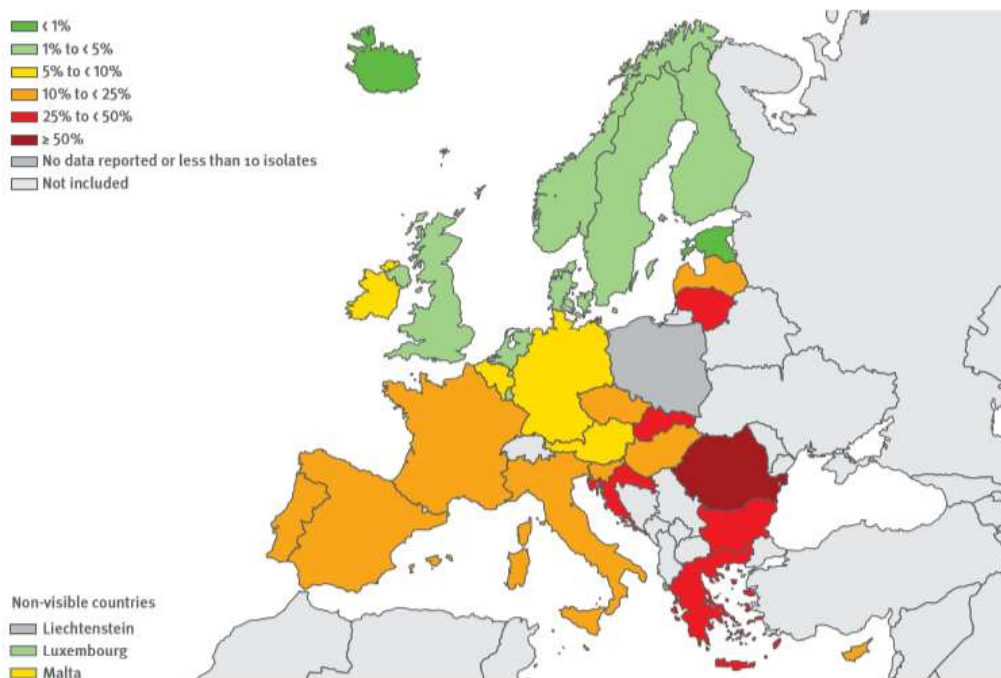


Figura 12 - Percentagem de estirpes isoladas que apresentam resistência a três ou mais dos seguintes antibióticos: Piperacilina+ Tazobactamo, Ceftazidima, Fluoroquinolonas, Aminoglicosídeos e Carbapenemos, em 2014(WHO, 2014b).

Nos Estados Unidos da América estima-se que haja mais de 51 000 infeções associadas aos cuidados de saúde e que por ano morram cerca de 440 pessoas devido a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (CDC, 2013).

4.3.1. Mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos

Esta espécie bacteriana apresenta uma resistência intrínseca à maioria dos antibióticos devido às características da sua membrana externa e à presença de bombas de efluxo. Ficando assim suscetível a Quinolonas (Ciprofloxacina e Levofloxacina), Aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina e Tobramicina), Polimixinas (Polimixina B e Colistina), e a alguns Beta-Lactâmicos (Piperacilina-Tazobactamo, Ceftazidima, Cefepima, Imipenemo, Doripenemo e Meropenemo) (Mulcahy, Isabella, & Lewis, 2013).

A resistência a esta classe de antibióticos deve-se a mecanismos de resistência adquirida tais como:

- Mutações nos alvos dos antibióticos, tais como, alterações nas PBPs;

- Mutações nos genes que codificam as enzimas do tipo AmpC, que conferem resistência a Penicilinas e Cefalosporinas;
- Perda de proteínas de membrana responsáveis pela entrada de moléculas de antibiótico, nomeadamente aos Carbapenemos;
- Mutação nos genes que codificam para as bombas de efluxo, o que confere resistência aos Beta-Lactâmicos, Aminoglicosídeos, Fluoroquinolonas;
- A presença de biofilme reduz a permeabilidade que origina a acumulação de beta-lactamases e conseqüentemente a degradação de antibiótico (Mulcahy *et al.*, 2013).

Resistência aos Carbapenemos

A maioria dos antibióticos têm de ultrapassar a parede celular para chegar ao seu alvo. Os antibióticos Beta-Lactâmicos são moléculas pequenas hidrofílicas que entram na bactéria através de canais de porinas. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta diferentes canais de porinas, sendo o oprF o mais representativo. Apesar de existir estirpes mutantes sem o OprF, esta falta não é a principal causa para a resistência aos antibióticos, porque existem outras porinas que permitem este transporte. O OprD é uma porina direcionada para o transporte de aminoácidos e de moléculas de antibiótico. A ausência deste está relacionada com a resistência ao Imipenemo, que requer a presença destas porinas para se ligar ao seu alvo. No entanto, a ação de antibióticos como o Meropenemo não é afetada por esta ausência, o que indica que consegue ultrapassar a membrana externa com o auxílio de outras porinas (Mulcahy *et al.*, 2013).

A resistência desta espécie bacteriana também pode ser explicada pela ocorrência de mutações nos genes que codificam bombas de fluxo. *Pseudomonas aeruginosa* apresenta quatro bombas de fluxo diferentes: mexAB-oprM, mexXY-oprM, mexCD-oprJ e mexEF-oprN10. MexAB-oprM é o sistema responsável pela expulsão de toda a classe de Beta-Lactâmicos, enquanto que o mexEF-oprN expulsa só Carbapenemos. Os genes *mexR* que codificam estes sistemas estão presentes em todas as estirpes, no entanto quando ocorre uma mutação esta pode originar um aumento de expressão dos mexAB-oprM. É importante referir que todas as classes de antibióticos, com exceção das Polimixinas, são expulsos por um ou mais sistemas de fluxo (Mulcahy *et al.*, 2013).

Pseudomonas aeruginosa apresenta um outro mecanismo de resistência aos Carbapenemos que consiste na produção de carbapenemases, sendo que quando a bactéria está na presença desta subclasse ocorre um aumento da transmissão de genes que codificam para estas enzimas (Ruppé *et al.*, 2015).

Resistência às Cefalosporinas

Esta espécie bacteriana apresenta o gene *AmpC* que codifica para a produção de beta-lactamases. A sobreprodução destas enzimas confere resistência à Amoxicilina em associação com Ácido Clavulânico, Cefalosporinas de 1ª e 2ª Geração, Ceftriaxone e Ertapenemo. No entanto, antibióticos com Piperacilina, Ceftazidima, Cefepima, Imipenemo, Meropenemo e Doripenemo não são suscetíveis de sofrerem hidrólise por estas enzimas (Lambert, 2002).

Pseudomonas aeruginosa também pode produzir ESBLs que são ativas contra Penicilinas e Cefalosporinas (Lambert, 2002)

4.3.2. Tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

Terapêutica de primeira e segunda linha

Quando a estirpe é suscetível utiliza-se derivados da Penicilina em associação com inibidores das beta-lactamases, como por exemplo, Piperacilina em associação com o Tazobactamo: 4.5 g com intervalo de 6 horas ou 3.375 g em intervalos de 4 horas. Uma alternativa consiste no uso de Cefalosporinas, tal como, Ceftazidima: 2 g em intervalos de 8 horas ou Cefepima: 2 g em intervalos de 8 horas. Quando não são suscetíveis aos antibióticos anteriormente referidos utiliza-se Monobactamo, como o Aztreonam 2 g em intervalos de 8 horas ou Carbapenemos, como Meropenemo: 1 g a cada 8 horas ou Doripenemo: 500 mg a cada 8 horas.

As doses referidas são utilizadas em doentes sem outras patologias associadas (Johns Hopkins Medicine, 2016).

Terapêutica alternativa

Para o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente utiliza-se Ceftolozane em associação com Tazobactamo (1,5 – 3 g em intervalos de 8 horas) ou Colistina (5 mg/kg). A dose é ajustada de acordo com a clearance de creatinina (Johns Hopkins Medicine, 2016).

4.4. *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae é a bactéria responsável pela gonorreia, uma infeção sexualmente transmissível (IST). Esta infeção é considerada a segunda mais comum das IST causadas por bactérias. É caracterizada, de uma forma geral, por uma inflamação na faringe, uretra, cérvix ou no recto. Pode ser assintomática nas mulheres, o que leva ao não tratamento e a longo prazo a complicações mais sérias devido à falta de tratamento. Estas complicações traduzem-se em gravidez ectópica, infertilidade, entre outros. Nos homens quando não tratadas pode levar a epididimites e infertilidade. O controlo da propagação destas bactérias depende de uma identificação rápida e do tratamento não só da pessoa infetada mas também dos seus parceiros (WHO, 2016).

Neisseria gonorrhoeae é frequentemente resistente a múltiplas classes de antibióticos, nomeadamente a Cefalosporinas. A OMS estima que num período de 10 anos vai haver um aumento de 75 000 casos de inflamação pélvica, a qual é a maior causa de infertilidade, de 15 000 casos de epididimites e mais de 222 casos infeção pelo HIV, pois este vírus é transmitido mais facilmente quando existe uma coinfeção (Unemo & Shafer, 2014).

4.4.1. Mecanismos de resistência aos Antibióticos Beta-Lactâmicos

Neisseria gonorrhoeae tem vindo a adquirir resistência aos seguintes antibióticos: Penicilinas, Cefalosporinas, Azitromicina e Tetraciclina, como podemos ver na figura 13.

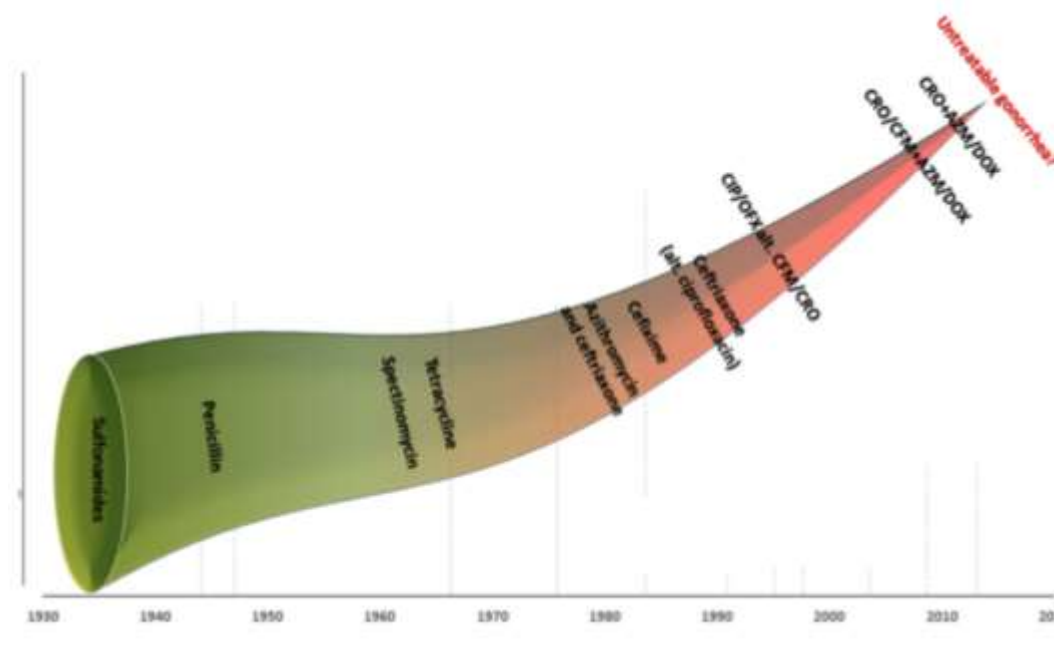


Figura 13 - Antibióticos eficazes ao longo dos anos em *Neisseria gonorrhoeae* - SUL, Sulfonamidas; PEN- Penicilinas; TET- Tetraciclina; CIP- Ciprofloxacina; OFX- Ofloxacin; CFM-Cefixima; CRO- Ceftriaxona; AZM - Azitromicina; DOX-Doxicilina (Unemo, 2015);

A aquisição de genes por esta espécie bacteriana apresenta um importante papel na resistência aos antibióticos, pois esta apresenta-se sempre num estado de competência para a transformação.

Esta “Superbactéria” apresenta como mecanismo principais:

1. Destruição enzimática das moléculas de antibióticos;
2. Modificação ou proteção do alvo;
3. Diminuição do influxo (Unemo, 2015);

Resistência à Penicilina

Como já foi referido, a espécie *Neisseria gonorrhoeae* apresenta-se sempre num estado de competência pelo que é capaz de adquirir genes exógenos com facilidade. É frequente esta bactéria ser recetora de material genético, através do processo de conjugação, sendo normalmente *Haemophilus parainfluenzae* a espécie dadora (Unemo & Shafer, 2014).

Um dos genes envolvido na resistência bacteriana é o *bla*TEM-1 que codifica para a beta-lactamase TEM-1 (hidrolisadora do anel beta-lactâmico) (Unemo & Shafer, 2014).

A resistência à Penicilina também pode ser explicada por mutações, nas quais ocorre uma inserção do aminoácido aspartato, no gene *penA* que codifica a enzima PBP2 e por mutações no gene *penB*, que codifica porinas presentes na membrana denominadas de PorB. PorB pode existir de duas formas alélicas: PorB1a e PorB1b. Estirpes com o alelo PorB1b são mais resistentes à penicilina do que as estirpes com o alelo PorB1a (Unemo & Shafer, 2014).

Por ser naturalmente competente, esta espécie bacteriana também pode adquirir plasmídeos que codificam penicilinases, como TEM-1 e TEM-135, que hidrolisam a ligação amida do anel beta-Lactâmico (Unemo & Shafer, 2014).

Um outro mecanismo de resistência de *Neisseria gonorrhoeae* consiste na ocorrência de um polimorfismo de um único nucleótico, ou seja, uma única variação de nucleótico no gene *ponA* que codifica para a enzima PBP1, no qual resulta uma diminuição da afinidade em duas a quatro vezes desta enzima para com a molécula de penicilina (Ohnishi *et al.*, 2011).

Resistência às Cefalosporinas

A resistência às Cefalosporinas deve-se a mais do que um mecanismo de resistência, sendo eles, mutações nos genes que codificam PBPs, diminuição do influxo e aumento do efluxo. Em semelhança ao que ocorre no mecanismo de resistência às penicilinas mutações no gene *penA* que codifica para as PBP2 também originam resistência a esta subclasse de antibióticos Beta-Lactâmicos. No entanto, em contraste ao que acontece na resistência à Penicilina, estirpes multirresistentes apresentam cerca de 60 a 70 alterações nos aminoácidos, e as mutações no gene *penA* não ocorrem devido à inserção do aminoácido aspartato. Este alelo de *penA* surgiu através do processo de transformação e posterior recombinação de genes

exógenos, sendo *Neisseria perflava*, *Neisseria sicca*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria cinérea* as espécies dadoras (Unemo & Shafer, 2014).

4.4.2. Tratamento de infeções por *Neisseria gonorrhoeae*

Terapêutica de primeira e segunda linha

É recomendado uma associação de 250 mg Ceftriaxone intramuscular com 1 g Azitromicina oral ou Cefixima 400 mg oral em associação com 1 g de Azitromicina (WHO, 2016).

Terapêutica Alternativa

Como terapia alternativa aos antibióticos anteriormente referidos pode utilizar-se uma única dose de Ceftriaxone 500 mg em associação com 2 g de Azitromicina. Em alternativa pode utilizar-se Cefixima (800 mg oral) em dose única em associação com Azitromicina (2g). As doses indicadas são para doentes sem outras patologias associadas (WHO, 2016).

4.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus pode ser considerado uma bactéria comensal ou patogénica no nosso organismo. Aproximadamente 30% da população humana apresenta esta bactéria na pele. No entanto, enquanto oportunista causa infeções na pele, osteoarticulares, tecidos moles, bacteriemia e endocardite. Algumas estirpes desta espécie conseguem produzir toxinas, que provocam intoxicações alimentares (ECDC, 2016).

Staphylococcus aureus resistente à metilina (MRSA) é uma das causas mais frequentes de infeções hospitalares na Europa. A incidência de MRSA tem vindo a aumentar ao longo dos anos, o que leva à utilização de antibióticos de segunda linha. Estes antibióticos são mais caros e apresentam um maior número de efeitos adversos, sendo necessário a sua monitorização. No passado, MRSA causava infeções a níveis hospitalares enquanto que hoje também causa infeções adquiridas na comunidade. MRSA também pode infetar gado, pelo

que pode ocorrer uma transmissão de animais para humanos, sendo assim denominado de LA-MRSA (MRSA associado ao gado) (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015).

Como podemos ver pela figura 14, em Portugal cerca de 25%-50% dos isolados de *Staphylococcus aureus* são resistente à Meticilina (ECDC, 2016).

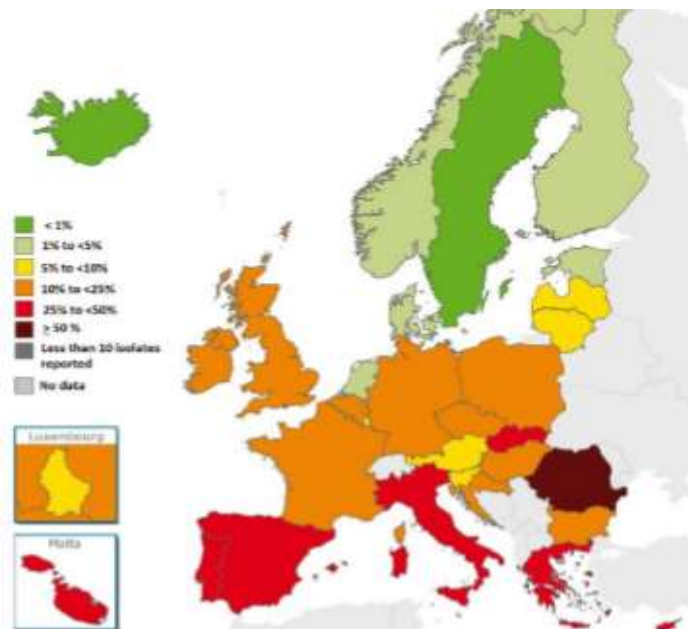


Figura 14 -Percentagens de MRSA na Europa em 2015(ECDC, 2016)

4.5.1. Mecanismo de Resistência aos Antibiótico Beta-Lactâmicos

Staphylococcus aureus apresenta dois mecanismos de resistência aos Beta-Lactâmicos:

1. A produção de beta-lactamases- codificadas pelo gene *blaZ*;
2. Alteração de PBPs, nomeadamente a PBP2a (Hiramatsu *et al.*, 2014);

Resistência aos Beta-Lactâmicos

A Meticilina começou a ser utilizada para combater infecções causadas por esta bactéria em 1959. Em 1961, foi reportado a primeira resistência desta bactéria a este antibiótico, sendo que rapidamente se espalhou por todo o mundo. MRSA teve origem em *Staphylococcus aureus* suscetível à meticilina (MSSA). Quando MSSA adquiriu através do processo de transferência horizontal o gene *mecA*, tornou-se resistente a este antibiótico (Peres, Neves, Vieira, & Devesa, 2014). A transferência horizontal ocorreu através de um elemento genético móvel, denominado de *cassete cromossômica estafilocócica* (SCC). A SCC que apresenta o gene *mecA* é denominada de SCCmec, sendo que este depois de adquirida é integrada no cromossoma de *Staphylococcus aureus*. SCCmec, como podemos observar na figura 15, é constituída por um complexo de gene *mec*, e por um complexo de gene *ccr*. O primeiro complexo apresenta o gene *mecA*, que codifica para a resistência à Meticilina. Os genes *mecRI* e *mecI* são genes reguladores e o gene *ccr* é um complexo que é responsável pela integração no cromossoma, sendo denominado de “cassete chromosome recombinase” (CCR) (Hiramatsu *et al.*, 2014).

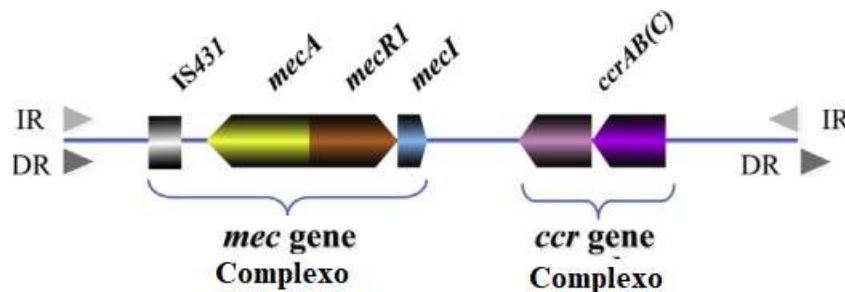


Figura 15 -Cassete cromossômica de *Staphylococcus Aureus* (Hiramatsu *et al.*, 2014)

Existem 8 tipos de SCCmec. Estes diferem na sua estrutura, combinação do gene *mec* com o gene *ccr* e nos genes R que transportam. Os tipos I, IV, V, VI e VII normalmente só transportam os genes *mecA*, enquanto que os do tipo II, III e VIII podem apresentar outros genes que conferem resistência a outros antibióticos (Reygaert, 2013).

O gene *mecA* codifica a PBP2, que é considerada uma transpeptidase ineficiente. A PBP2 desta espécie apresenta pouca afinidade para com os antibióticos Beta-Lactâmicos, o

que faz com que a ligação entre a molécula de antibiótico e o local ativo desta PBP não ocorra (Reygaert, 2013).

Um outro mecanismo de resistência aos Beta-Lactâmicos consiste na aquisição de um plasmídeo que contem o gene *blaZ*, que codifica para a produção de beta-lactamases. Esta enzima é sintetizada apenas quando *Staphylococcus Aureus* está na presença desta classe de antibióticos. A expressão do gene *blaZ* é regulada pelos genes anti-repressor *blaR1* e pelo repressor *blaI* (Reygaert, 2013).

Staphylococcus aureus foi englobado na monografia, porque o número de resistências está a aumentar à classe dos Beta-Lactâmicos, Quinolonas e à Vancomicina. O mecanismo de resistência a estas duas últimas classes não vai ser abordados na presente monografia.

4.5.2. Tratamento de infeções por *Staphylococcus aureus*

Terapêutica de primeira e segunda linha

Se a estirpe for MSSA, a terapia de 1ª Linha é a Penicilina, no entanto se a infeção for uma bacteriemia deve ser administrado Flucloxacilina (2 g a cada 8 horas) ou Oxacilina (2 g a cada 4 horas). Se ocorrer alergia a estes fármacos pode ser utilizada Cefazolina (2 g a cada 8 horas) (Hiramatsu *et al.*, 2014).

Terapêutica Alternativa

Como terapia alternativa pode utilizar-se Vancomicina (15 mg/kg a cada 12h). Este antibiótico é menos eficaz que os Beta-Lactâmicos, pelo que só deve ser administrada quando há resistência ou intolerância a esta classe. Outra alternativa consiste na Daptomicina (6mg/kg IV) (Hiramatsu *et al.*, 2014).

5. Causas do aparecimento de Superbactérias

São inúmeras as causas para o aparecimento de Superbactérias. Na presente monografia apenas serão discutidas as seguintes: uso inapropriado de antibióticos, uso excessivo na produção de animais, descarte inadequado de antibióticos, falhas hospitalares, diminuição do desenvolvimento de novos antibióticos e má adesão à vacinação.

5.1. Uso inapropriado de antibióticos

Um uso inapropriado pode significar:

a) Má prescrição

Uma má prescrição pode referir-se ao uso de antibióticos para o tratamento de patologias não causadas por bactérias ou ao uso de antibiótico em condições sub-ótimas, como por exemplo, o uso de antibióticos de espectro desnecessariamente amplo (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

Segundo o CDC, cerca de 47 milhões de antibióticos prescritos nos EUA, por ano, são desnecessários, pois a maioria destes antibióticos são prescritos para patologias causadas por vírus. A maioria destas patologias são respiratórias, tais como, constipações, gripes, sinusite, entre outras. Esta má prescrição faz com que haja um aumento de reações alérgicas, reações adversas, assim como uma maior suscetibilidade a outras infeções, tais como infeções urinárias e diarreia (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

A prescrição inadequada pode acontecer devido à necessidade de um rápido diagnóstico e início da terapêutica. Sendo assim, é frequente os médicos receitarem antibióticos de acordo com a sua experiência e epidemiologia local, ou seja, trata-se de um tratamento empírico. Este tratamento empírico pode ser útil nos casos em que é necessário o começo imediato da terapêutica e enquanto se realiza o teste de suscetibilidade da bactéria ao antibiótico. No entanto, quando a terapia empírica não é apropriada é necessário o uso de outro antibiótico (Center for Disease Dynamics Economics & Policy, 2015).

b) Automedicação e má adesão à terapêutica

Uma outra causa para o aparecimento de resistências aos antibióticos é a automedicação. A automedicação significa a toma de medicamentos sem indicação médica. Existem inúmeras razões que levam as pessoas a automedicarem-se, tais como: conselho de um amigo ou familiar, o facto de em certas localidades do País a espera para uma consulta no sector público ser longa e das consultas no sector privado serem caras e porque pensam que a ida ao médico é de evitar se não se tratar de uma doença grave (Rathera, Kim, Bajpai, & Parka, 2017).

Uma má adesão à terapêutica, ou seja, dosagem ou período de toma incorreto, também origina o aparecimento de resistências. Hoje em dia, é frequente o doente parar a toma do antibiótico no momento em que se começa a sentir melhor não terminando assim o tratamento. Uma outra situação frequente é a toma de antibiótico remanescente de infeções anteriores (Michael, Dominey-Howes, & Labbate, 2014).

5.2. Uso de antibióticos nos animais e descarte inadequado no ambiente

O uso de antibióticos de forma excessiva na produção de animais de consumo humano também contribui para aumentar o aparecimento de resistências aos antibióticos. A justificação para o tal uso excessivo tem por objetivo uma produção mais rápida, maior e de maior qualidade dos animais (Landers, Cohen, Wittum, & Larson, 2012).

A elevada produção de gado leva a uma partilha da flora comensal e de agente patogénicos entre os animais. Por isso, os produtores recorrem ao uso de antibióticos para prevenir e impedir a propagação destas infeções. As galinhas e os porcos são dos animais que mais consomem antibióticos (World Health Organization, 2014).

Por exemplo, nos EUA cerca de 16 % das vacas leiteiras recebem, principalmente, Penicilinas e Cefalosporinas para tratamento de infeções na glândula mamária, ou seja, mastite. E quase 100 % destes animais recebem estes antibióticos de forma profilática para evitar esta infeção (World Health Organization, 2014).

Uma outra causa consiste no tipo de antibióticos usados em veterinária, isto é, dos 27 antibióticos mais usados nos animais, apenas 9 são de uso exclusivo nos animais (World Health Organization, 2014).

Também na aquacultura utilizam-se antibióticos para a criação de salmão e camarão. O uso excessivo de antibióticos leva ao aparecimento de bactérias resistentes presentes não só nos animais, mas também na população humana que consome estes animais e no meio ambiente. Por exemplo, em 2011, em Inglaterra, 11 pessoas ficaram infetadas com salmonela que apresentava resistência a inúmeros antibióticos, tais como: Amoxicilina em associação com Ácido Clavulânico, Ampicilina, Ceftriaxone, entre outros (World Health Organization, 2014).

As bactérias conseguem propagar-se de inúmeras formas entre animais e humanos. A exposição direta aos animais ou o consumo de carne mal cozinhada aumenta o risco de colonização e infeção no Homem. No caso de animais alimentados com rações contendo antibióticos, a infeção ou colonização humanas poderão ter origem em bactérias multirresistentes. Mas esta propagação também pode ocorrer de forma indireta tal como o transporte de animais pode causar dispersão de bactérias resistentes ao longo da rota utilizada, elementos genéticos móveis de bactérias resistentes podem ser incorporados noutros microrganismos e causar infeções no homem, os fertilizantes de origem animal podem conter bactérias resistentes que contaminam as águas. Existem bactérias que apresentam apenas como reservatório o homem, no entanto a maioria apresenta também como reservatório os animais (figura 16) o que faz com que seja mais difícil o combate às Superbactérias (Landers, *et al.*, 2012).

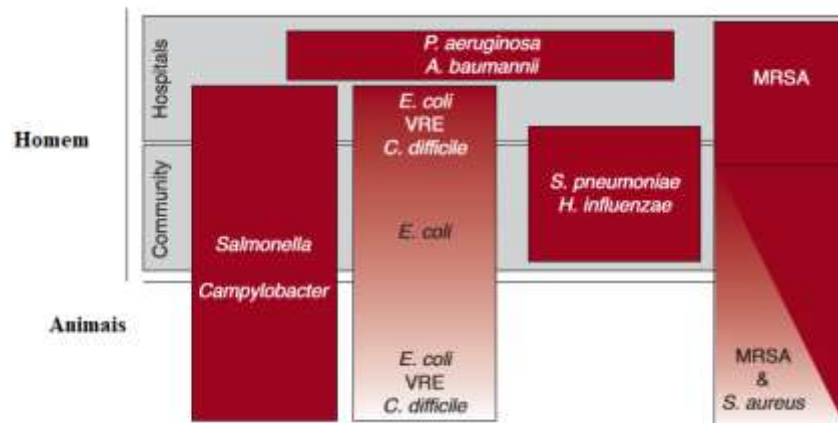


Figura 16 - Bactérias de maior relevo e os seus diferentes reservatórios (World Health Organization, 2014)

Um outro veículo de bactérias é a água, através de consumo direto, sistemas de irrigação, entre outros. A água pode ajudar a disseminar bactérias que apresentam genes R. Relativamente ao ambiente, resíduos de antibióticos provenientes de fábricas, mas também da conspurcação com fezes e urinas excretados pelos animais e humanos, contribuem para a dispersão de bactérias eventualmente multirresistentes (Ventola, 2015).

O facto de alguns hospitais fazerem um descarte inadequado de certos materiais com resíduos de antibióticos, mas também o facto de algumas pessoas não terminarem a toma do antibiótico e o deitarem em lixo não próprio leva a que resíduos de antibióticos sejam encontrados no solo e em águas subterrâneas. Sendo que, uma vez no ambiente o procedimento de tratamento de água não é suficiente para a eliminação de alguns antibióticos (Ventola, 2015)

5.3. Falhas Hospitalares

As infeções adquiridas nos hospitais devido a Superbactérias contribuem de forma significativa para a morbilidade e mortalidade (Krzowska-firych, Sukhadia, & Al-mosawi, 2014).

Estima-se que em cada ano cerca de 4 100 000 pessoas adquiram uma infeção deste tipo na União Europeia e cerca de 37 000 pessoas morram devido a resistências a antibióticos. Mais de 70% das bactérias que causam infeções adquiridas no hospital são resistentes a pelo menos 1 antibiótico (Krzowska-firych, *et al.*, 2014).

Estas infeções acontecem devido à seleção de estirpes bacterianas resistentes e à fácil transferência de genes R, como consequência do excesso de prescrição de antibióticos nestes ambientes.

Esta propagação de Superbactérias acontece devido ao não cumprimento das medidas de contenção por parte dos profissionais de saúde, nomeadamente a não substituição de avental e luvas e a falhas na higienização nos hospitais, quer em materiais quer através das mãos dos profissionais de saúde e consequente disseminação (Krzowska-firych *et al.*, 2014).

5.4. Decréscimo do desenvolvimento de Antibióticos

O ritmo de desenvolvimento de novos antibióticos tem vindo a diminuir ao longo das últimas três décadas como podemos ver na figura 17.

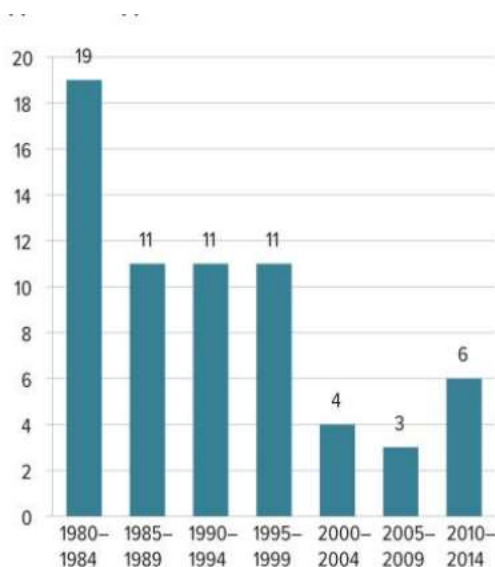


Figura 17 -Desenvolvimento de novos antibióticos ao longo dos anos (Ventola, 2015)

Esta diminuição aconteceu porque o desenvolvimento destes fármacos não é considerado um investimento seguro, isto porque os antibióticos são usados por um curto período de tempo. Sendo assim, as indústrias decidiram apostar no desenvolvimento de fármacos para patologias crónicas e de uso profilático (Ventola, 2015).

5.5. Relutância no uso de vacinas

Atualmente, existem vacinas que permitem a imunização contra bactérias. Vacinas contra doenças provocadas por *N. meningitidis* (Meningite), *Clostridium tetani* (tetano) ou *Bordetella pertussis* (tosse convulsa) estão integradas no Plano Nacional de Vacinação (PNV, 2016). No entanto, existem campanhas anti vacinação em alguns países. As principais causas desta relutância são questões de segurança, crenças pessoais, culturais e religiosas. O facto de algumas pessoas não estarem imunizadas origina uma maior facilidade de propagação e posterior infeção. No caso das infeções bacterianas, resulta num maior consumo de antibiótico, o qual poderia ser evitado (Larson, 2013).

5.6. Ciclo de Propagação de bactérias

O aparecimento e desenvolvimento de resistência aos antibióticos não apresenta uma só causa, mas sim várias causas que estão interligadas, representadas na figura 18. O Homem pode adquirir bactérias resistências por contacto direto ou indireto, como por exemplo, através do toque de objetos contaminados ou consumo de alimentos contaminados. Quando estamos a ingerir alimentos malcozinhados, temos mais probabilidades de ficar infetados, isto porque as bactérias presentes nestes alimentos não morrem durante o processo de confeção. Estas bactérias podem colonizar o organismo humano ou podem através de mecanismos de transferências de genes induzir resistência nas bactérias comensais humanas, nomeadamente as do intestino (Rathera *et al.*, 2017).

Se estes doentes forem hospitalizados e se as práticas de higiene não forem eficazes, as bactérias resistentes vão infetar outros doentes e quem entra em contato com eles. Pessoas infetadas e sem sintomas no início da infeção são um ótimo veículo de propagação bacteriana. Estes podem contaminar outras pessoas e animais, através de contato direto ou indireto. Água, fezes e objetos servem como veículo das bactérias, podendo contaminar humanos, animais e o ambiente, sendo assim um ciclo de propagação bacteriana se não forem tomadas medidas para as combater (Rathera *et al.*, 2017).

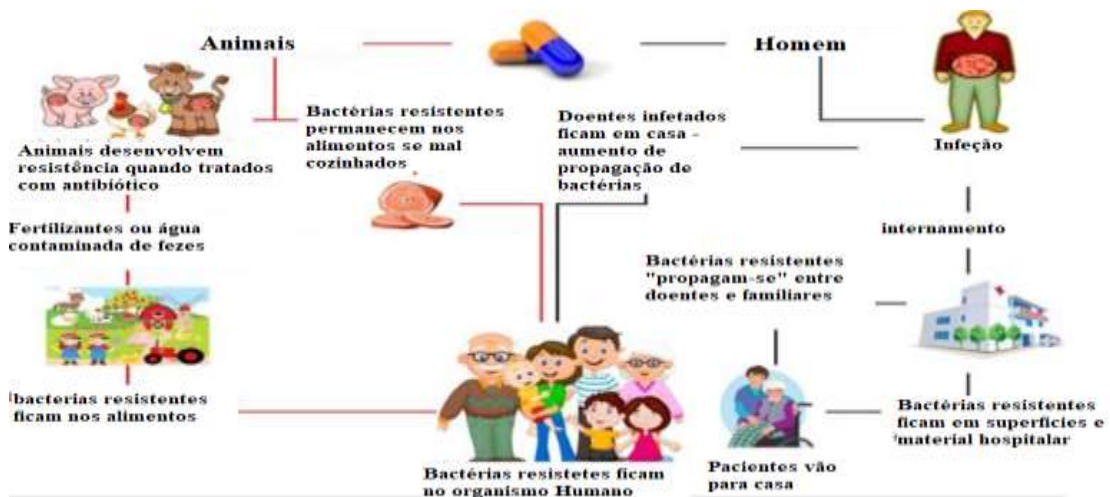


Figura 18 -Aparecimento e desenvolvimento de resistência aos antibióticos (Rathera *et al.*, 2017)

6. Estratégias para minimizar a Resistência bacteriana

Como referido anteriormente, existem inúmeros fatores que contribuem para o uso irracional de antibióticos. Como tal, não existe apenas uma estratégia, mas várias para reduzir o número a carga genética de multirresistência.

Todos temos um papel fundamental no uso racional do antibiótico.

6.1. Médicos

- A melhoria da prescrição é uma importante medida de combate ao aparecimento de resistências, sendo que para tal é necessária uma formação adequada dos médicos. Esta educação deve ser académica e pós-graduada, ou seja, deve ser uma formação contínua. É necessário fornecer material de apoio, tais como, *newsletters*, *guidelines* de tratamento, literatura clínica, entre outros. A nível hospitalar é necessário a revisão da terapia após 2-3 dias do seu começo, tendo em conta o estado clínico do doente e exame microbiológico (WHO, 2015).

- Prescrição de antibióticos de acordo com as *guidelines*;
- A educação do doente deve ser feita através de:
 - Promoção de uma boa comunicação entre o profissional de saúde e o paciente;
 - Fornecimento de material e informação apropriada sobre o correto uso de antibióticos;
 - Manutenção de estilos de vida saudável como forma de prevenção de infeções;
 - Conhecimento das consequências do uso incorreto: a importância de não tomar antibióticos se não for por indicação médica, sendo que a dosagem e intervalo de toma devem ser respeitados;

- Informação para a prática correta de lavagem de mãos, e outras formas de contenção da transmissão de bactérias;
- Reforço da importância da vacinação.
- Conhecimento de quais os antibióticos a que as bactérias presentes na comunidade em que está inserido são resistentes e prescrição em função do conhecimento dessa resistência;
- Implementação de medidas de prevenção de infeção, tal como, medida de higiene de mãos, entre os pacientes (WHO, 2015);

6.2. Paciente e Família

- Obter conhecimento sobre o uso correto dos antibióticos, para que servem, em que situações se devem usar, entre outros;
- Saber o que pode fazer para aliviar os sintomas;
- Saber como se toma o antibiótico de forma correta: duração da terapêutica, intervalo de administração;
- Manutenção de estilos de vida saudável como forma de prevenção;
- Manutenção de uma boa higiene;
- Receber a vacinação recomendada;
- Não comprar antibióticos sem prescrição (O’Neill, 2014).

6.3. Hospitais e outros locais de prestação de cuidado de saúde

- Monitorização dos antibióticos prescritos;
- Conhecimento de quais são as bactérias resistentes na unidade de prestação de cuidados;
- Requerer o teste de suscetibilidade a antibióticos;
- Educar os médicos para que haja uma otimização da prescrição;
- Medidas de higienização das mãos;
- Rastreio dos doentes para Superbactérias e seu isolamento;

- Educação do pessoal do hospital e análise e discussão sobre a terapia escolhida e duração (WHO, 2014a);
- Implementação de Programas que permitam o controlo do uso de antibiótico e da resistência bacteriana. Em Portugal, o Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA) que tem como objetivo a redução das taxas de infeção e da taxa de microrganismo resistentes em meios hospitalares e na comunidade (DGS, 2013).
- Aviso pelo programa informático do número de dias da toma de antibiótico e suspensão automática da prescrição no último dia estabelecido como fim de terapêutica;
- Utilização de testes de diagnóstico mais rápidos;
- Desinfecção de bancadas e esterilização adequada dos materiais(WHO, 2014a);

6.4. Educação da População em geral

A educação da população abrange os aspetos referidos na educação do doente e família, mas não é só.

É muito importante a educação em particular dos agricultores, produtores de animais e veterinários.

Para tal é necessário:

- Desenvolvimento de sistemas nacionais para monitorização do uso de antibióticos na produção de animais de consumo;
- Uso das *guidelines* pelos veterinários, com o objetivo de diminuir o uso excessivo e desnecessário de antibióticos;
- Prevenção de infeções nos animais através da vacinação e melhoria da higiene,
- Redução da prescrição de antibióticos uso humano nos animais;
- Os veterinários apenas devem prescrever antibióticos para uso terapêutico;
- Gestão de resíduos de medicamentos e respetivas embalagens, de forma a que haja um correto descarte, entre outras (Van Boeckel *et al.*, 2015).

6.5. Medidas Políticas

- Fornecer ferramentas para implementação de protocolos de prescrição de antibióticos, assim como de prevenção de infeções;
- Apoiar todos os profissionais de saúde para que estes forneçam informação adequada à população sobre o uso racional dos antibióticos;
- Apoiar o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico, novas terapêuticas ou alternativas para o combate da resistência bacteriana;
- Definir objetivos para a restrição do uso de antibiótico tanto no Homem como nos animais;
- Incentivar as indústrias a desenvolverem novos antibióticos;
- Incluir no curso de Medicina Veterinária, um conhecimento aprofundado sobre resistência bacteriana e uso prudente de antibióticos (Roca *et al.*, 2015).

6.6. Indústria Farmacêutica

- Desenvolvimento de novos antibióticos eficazes contra as bactérias resistentes;
- Desenvolvimento de testes rápidos que permitam a identificação das bactérias e a sua suscetibilidade aos antibióticos no consultório médico, para que a prescrição seja a mais adequada e de forma a evitar a prescrição de antibióticos quando se trata de infeções virais (Roca *et al.*, 2015).

6.7. Farmacêutico

6.7.1. Comunitário

Como profissional de saúde que tem uma relação privilegiada com o doente, o farmacêutico comunitário não tem só um papel importante na educação do doente como da população em geral. O papel do farmacêutico comunitário na prevenção, identificação e resolução de problemas relacionados com os medicamentos é crucial para garantir a qualidade de vida do utente. O farmacêutico tem o dever de promover o uso racional do medicamento.

Para tal, é necessário que seja bom comunicador, ou seja, que consiga abordar de forma clara e objetiva as informações necessárias sobre o uso do medicamento. Também tem a função de ser supervisor e promotor de saúde pública (WHO, 2014c). A educação do doente pelo farmacêutico comunitário abrange os seguintes pontos:

- Promotor de saúde pública: quer na farmácia durante a dispensa e aconselhamento ao utente quer através de campanhas de sensibilização fora da farmácia comunitária;
- Prevenção e controlo de infeções: educação sobre as medidas de prevenção de infeções o que resulta conseqüentemente na diminuição de infeções e do uso de antibióticos; Incentivo de medidas a adotar como a lavagem das mãos, a maneira correta de espirrar e de tossir, o isolamento de doentes infetados, entre outros.
 - Incentivo à vacinação;
 - Triagem: tratamento dos sintomas sem recorrer ao uso de antibióticos;
 - Referenciar a ida ao médico quando necessário (WHO, 2014c);

6.7.2. Hospitalar

O farmacêutico hospitalar apresenta um papel importante na validação da prescrição, em que verifica a adequação do antibiótico à infeção, a posologia, duração da terapêutica, os ajustes da dose em alguns casos se p.e se tratar de um doente com insuficiência renal ou hepática.

Os farmacêuticos hospitalares como conhecedores de microbiologia e de técnicas de assepsia devem ajudar no estabelecimento de normas de higienização do hospital.

Responsabilidade de implementar programas de diminuição do consumo de antibióticos (WHO, 2014c).

7. Novos antibióticos

Desde 2010 foram introduzidos três novos antibióticos Beta-Lactâmicos no mercado, sendo eles:

- I. **Ceftobiprole (Zevtera[®], Mabelio[®])** - é uma Cefalosporina de 5^a geração. Está indicado para pneumonias adquiridas no hospital e é ativo contra MRSA. No entanto, é hidrolisado pelas enzimas ESBLs e AmpC. Não apresenta ação contra a família *Enterobacteriaceae*. Este pode ser considerado uma alternativa quando se trata de MRSA (Vincent *et al.*, 2016).
- II. **Ceftazidima - Avibactamo (Avycaz[®])** - esta associação foi autorizada pela FDA em 2015. Está indicada para infeções complicadas intra-abdominais. A Ceftazidima é uma cefalosporina que já tinha sido aprovada em 1985, no entanto, esta associação é recente. Como a Ceftazidima é suscetível de ser hidrolisada pelas ESBLs, o facto de estar associada com o Avibactamo faz com que seja resistente a enzimas como ESBLs, AmpC e carbapenemases. No entanto, o Avibactamo não inibe as enzimas metalo-lactamases. É importante referir que este último, como é um inibidor de beta-lactamases, não apresenta ação contra outros mecanismos de resistência, como por exemplo, as bombas de efluxo (Vincent *et al.*, 2016).
- III. **Ceftolozane-Tazobactam (Zerbaxa[®])** – este consiste numa associação de uma Cefalosporina de 5^a geração com um inibidor das beta-lactamases. Apresenta uma atividade melhorada contra *Pseudomonas sp.* No entanto, não é estável quando na presença de beta lactamases como as carbapenemases. Pode ser utilizado para o tratamento de infeções causadas por bactéria da família *Enterobacteriaceae* produtora de ESBL (Vincent *et al.*, 2016).

8. Futuro

Terapia Antibiótica

Atualmente existem alguns antibióticos em estudos clínicos, tais como:

- O fármaco LPC-069, demonstrou eficácia contra bactérias resistentes. Apresenta como mecanismo de ação a inibição da enzima LpxC, enzima importante para a formação da membrana externa das bactérias Gram-negativo (Lemaître *et al.*, 2017).
- Inibidores das beta-lactamases, como o Avibactamo, mostram um espectro alargado contra enzimas da classe A, B e C de Ambler, não sendo ativos contra metalo-lactamases, pelo que estão a ser testados em associação com Monobactamos e Carbapenemos(Vincent *et al.*, 2016).
- O inibidor RPX7007 em associação com um novo Carbapenemo, denominado de Biapenemo, tem demonstrado uma elevada eficácia contra bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos Carbapenemos(Vincent *et al.*, 2016).
- Um novo Monobactamo denominado de Relebactamo em associação com Imipenemo mostra eficácia contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (Vincent *et al.*, 2016).

Terapia Não antibiótica

Terapia alternativa utilizando bacteriófagos- os bacteriófagos são vírus que infetam bactérias. O objetivo desta terapia consiste na administração de bacteriófagos com o objetivo de lisar as bactérias patogénicas causadores da infeção. Os bacteriófagos apresentam vantagens e desvantagens em relação ao uso de antibióticos. Relativamente à segurança dos antibióticos, as reações adversas aos mesmos já estão bem documentadas, enquanto que a segurança da terapia fágica ainda não está bem documentada (Golkar, Bagasra, & Gene Pace, 2014). Esta terapia é considerada de forma geral segura, no entanto a maior preocupação é a passagem dos bacteriófagos pelo intestino e a sua chegada à corrente sanguínea.

Relativamente à especificidade, esta é a maior vantagem desta terapia, no entanto quando uma infeção é causada por várias estirpes de bactérias, se os fagos utilizados tiverem apenas como alvo uma estirpe bacteriana o uso destes é menos eficaz que o de antibióticos. Sendo por isso necessário o melhor conhecimento sobre as bactérias causadoras de infeção. Relativamente à penetração de biofilmes (substância produzidas pelas bactérias que lhes confere proteção) a terapia fágica é mais eficaz, pois estes apresentam enzimas na sua cápside que permite uma melhor penetração do biofilme. Os antibióticos também conseguem penetrar o biofilme, no entanto, de forma geral é necessária uma maior dose de antibiótico. Sendo que doses mais elevadas de antibiótico pode levar a toxicidade para o tecido. Um outro aspeto da terapia fágica é o “design dos cocktail”, pois a composição dos fagos é um aspeto essencial para o sucesso desta terapia (Ormälä & Jalasvuori, 2013).

- **Dispositivos de Hemofiltração**

Atualmente, existem vários dispositivos que filtram o sangue a ser estudados. O objetivo destes consiste na remoção dos agentes patogénicos da corrente sanguínea. Um dos filtros que tem mais destaque são os hemofiltros que incluem lectina ligadora de manose. Esta é uma proteína presente no plasma que faz parte do sistema imune inato e constitui o primeiro componente do sistema do complemento, tendo como principal função a neutralização de agentes patogénicos. Esta técnica permite, na teoria, ultrapassar o problema das Superbactérias (Opal, 2016).

- **Inibidores de deteção de quórum**

O quórum consiste num processo de comunicação entre bactérias, o que lhes permite partilhar “informações”. Com estas “informações” as bactérias conseguem ajustar a sua expressão genética, podendo, por exemplo, estar mais suscetíveis a adquirir genes exógenos que conferem resistência aos antibióticos. Moléculas que permitem a inibição da deteção do quórum estão a ser estudadas (Rutherford & Bassler, 2012).

- **Imunoterapia Avançada**

Estão a ser estudados anticorpos mono e policlonais que apresentam uma elevada afinidade contra proteínas específicas presentes nas bactérias. O objetivo é que estas anticorpos permitam uma melhor opsonização e posterior fagocitose das bactérias. Elementos como interleucina- 7 estão a ser estudados (Opal, 2016).

- **Limitação da virulência**

Estão a ser estudados sistemas de lipossomas que permitem a captação de citotoxinas. O objetivo destes é serem utilizados como terapia complementar aos antibióticos no tratamento de infeções provocadas por bactérias produtoras de exotoxinas. Estas toxinas são prejudiciais para as células e assim se forem captadas e absorvidas pelos lipossomas, conseguem proteger as células da lesão (Opal, 2016).

9. Conclusão

A resistência bacteriana à classe dos Beta-Lactâmicos continua a aumentar, principalmente nas bactérias Gram-negativo.

O número cada vez maior de Superbactérias é um problema complexo para o qual contribuem inúmeros fatores. Para combater este problema é necessário um uso racional dos antibióticos, desenvolvimento de novas terapias e novas tecnologias de diagnóstico. Para tal, é imprescindível um esforço de todos, dos médicos prescritores, do doente e família, dos farmacêuticos e outros profissionais de saúde, ou seja, de toda a comunidade. Um outro fator muito importante no combate à resistência bacteriana é a vigilância. Esta é essencial pois fornece informação sobre a identificação das Superbactérias, antibióticos a que são resistentes, a prevalência e dispersão geográfica das infeções causadas por estas bactérias e população em que ocorrem. Estes dados são de extrema importância pois permitem a adoção de medidas de controlo mais direcionadas e conseqüentemente mais eficazes.

Mais 6,5 biliões de pessoas vivem em Países no qual está a ser implementado um Plano de controlo da resistência bacteriana. Os resultados desta ação estão a ser favoráveis: aposta na educação de médicos, enfermeiros e outros profissionais de saúde sobre medidas preventivas assim como de tratamento de infeções; sistemas de vigilâncias; aumento da taxa de vacinação, melhorias no saneamento e tratamento de águas, melhores práticas de higiene e de criação de animais; uso mais racional do antibiótico não só nos humanos, como nos animais, ou seja, o antibiótico certo, na dose certa e com tempo de toma certo.

A escolha do antibiótico e a duração de administração precisam de ser personalizadas, tendo em conta as características do doente, os padrões locais de resistência bacteriana, a gravidade da doença, entre outros. Apesar de uma prescrição racional dos antibióticos poder levar a que o número de Superbactérias não aumente, são necessários novos antibióticos com outros mecanismos de ação e novas terapias adjuntas para combater os mecanismos de resistência existentes.

Visto que as Superbactérias adquirem constantemente novos mecanismos de resistência é necessário que haja constantemente um estudo aprofundado sobre eles, assim como dos seus reservatórios. É necessário que a comunidade seja pró-ativa e aproveite estes conhecimentos para implementar medidas que sejam eficazes.

10. Bibliografia

- Almasaudi, S. B. (2016). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi Journal of Biological.
- PNV. (2016). Programa nacional de vacinação - Avaliação 2016, 2–33.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology, 13(1), 42–51.
- Brooks, A. N., & Beer, K. D. (2012). Adaptation of cells to new environments (9), 1–24.
- Burmeister, A. R. (2015). Horizontal Gene Transfer: Figure 1. Evolution, Medicine, and Public Health, 2015(1), 193–194.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of Beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(3), 969–976.
- Cahill, S. T., Cain, R., Wang, D. Y., Lohans, C. T., Wareham, D. W., Oswin, H. P., *et al.*, (2017). Cyclic boronates inhibit all classes of beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(4).
- CDC. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Current, 114.
- Center for Disease Dynamics Economics & Policy. (2015). The State of the world’s antibiotics 2015. Centre for Disease Dynamics, Economics & Policy, CDDEP: Washington, D.C, 1–84.
- Chavda, K. D., Chen, L., Fouts, D. E., Sutton, G., Brinkac, L., Jenkins, S. G., *et al.*, (2016). Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter spp.*: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms, 7(6), 1–16.
- Chellat, M. F., Raguž, L., & Riedl, R. (2016). Targeting Antibiotic Resistance. Angewandte Chemie - International Edition, 55(23), 6600–6626.
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. International Journal of Medical Microbiology, 303(6–7), 287–292.

Daury, L., Orange, F., Taveau, J.-C., Verchère, A., Monlezun, L., Gounou, C., *et al.*, (2016). Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nature Communications*, 7, 10731.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), 417–433

DGS. (2013). Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e Resistências aos Antimicrobianos, 5.

ECDC. (2015). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2015.

ECDC. (2016). Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union, (November).

Engelstadter, J., & Moradigaravand, D. (2013). Adaptation through genetic time travel? Fluctuating selection can drive the evolution of bacterial transformation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1775).

European Union. (2016). Special Eurobarometer 445 - April 2016 “Antimicrobial Resistance.”

Fishbain, J., & Peleg, A. Y. (2010). Treatment of Acinetobacter infections. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(1), 79–84.

Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., & Sekawi, Z. (2014). Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, 17(1), 11–22.

Golkar, Z., Bagasra, O., & Gene Pace, D. (2014). Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. *Journal of Infection in Developing Countries*.

Harbarth, S., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Mendelson, M., Hospital, G. S., Town, C., *et al.*, (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.

Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., & Baba, T. (2014). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 20(10), 593–601.

Holmes, A. H., Moore, L. S. P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., *et al.*, (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176–187.

Howard, A., Donoghue, M. O., Feeney, A., & Sleator, R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen, (June), 243–250.

Infarmed. (2006). Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos, 191–211. retirado de <http://www.infarmed.pt/formulario/formulario.pdf>

Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509–514.

Kocsis, B., & Szabó, D. (2013). Antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 251–257.

Kong, K.-F., Scnheper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *Apmis*, 118(1), 1–36.

Koraimann, G., & Wagner, M. A. (2014). *ion*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(April), 1–7.

Krzowska-firych, J., Sukhadia, T., & Al-mosawi, L. K. (2014). Hospital-acquired infections caused by antibiotic resistant bacteria *Zakażenia szpitalne wywołane przez lekooporne bakterie*, (11), 783–786.

Kumar, S., & Varela, M. F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, 522–534.

Lakshmi, R., Nusrin, K. S., Georgy, S. A., & Sreelakshmi, K. S. (2014). Role of Beta Lactamases in Antibiotic Resistance: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 5(2), 37–40.

Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)*, 127(1), 4–22.

Larson, H. J. (2013). Negotiating vaccine acceptance in an era of reluctance. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 9(8), 1779–1781.

Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., *et al.*, (2017). *Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and*

Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(March), 55.

Lee, C. R., Cho, I. H., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2013). Strategies to minimize antibiotic resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.

Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., *et al.*, (2012). 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), 268–281.

Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health*, 2(September), 145.

Michalopoulos, A., & Falagas, M. E. (2010). Treatment of *Acinetobacter* infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(5), 779–788.

Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, 68(1), 1–12.

Munita, J. M., Arias, C. A., Unit, A. R., & Santiago, A. De. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance, 4(2), 1–37.

Muschiol, S., Balaban, M., Normark, S., & Henriques-Normark, B. (2015). Uptake of extracellular DNA: Competence induced pili in natural transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *BioEssays*, 37(4), 426–435.

O’Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, (December), 1–16.

Ohnishi, M., Golparian, D., Shimuta, K., Saika, T., Hoshina, S., Iwasaku, K., *et al.*, (2011). Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone, 55(7), 3538–3545.

Opal, S. M. (2016). Non-antibiotic treatments for bacterial diseases in an era of progressive antibiotic resistance. *Critical Care*, 20(1), 397.

Ormälä, A.-M., & Jalasvuori, M. (2013). Phage therapy: Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage*, 3(1), e24219.

Peres, D., Neves, I., Vieira, F., & Devesa, I. (2014). Estratégia para Controlar o *Staphylococcus Aureus* Resistente à Meticilina: A Experiência de Cinco Anos de um Hospital, 27(1), 67–72.

Rathera, I., Kim, B.-C., Bajpai, V. K., & Parka, Y.-H. (2017). Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Reygaert, W. C. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus aureus*, 297–305.

Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavalieri, M., Coenen, S., *et al.*, (2015). The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes and New Infections*.

Rumbo, C., Gato, E., Lopez, M., Ruiz De Alegria, C., Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., *et al.*, (2013). Contribution of efflux pumps, porins, and beta-lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5247–5257.

Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram - negative bacilli. *Annals of Intensive Care*.

Rutherford, S. T., & Bassler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(11), 1–25.

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1).

Silhavy, T., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), 1–16.

Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254–267.

Thenmozhi, S., Moorthy, K., Sureshkumar, B. T., & Suresh, M. (2014). Antibiotic Resistance Mechanism of ESBL Producing Enterobacteriaceae in Clinical Field : A Review, 2(3), 207–226.

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus Infections : Epidemiology , Pathophysiology , Clinical Manifestations , and Management, 28(3), 603–661.

Unemo, M. (2015). Current and future antimicrobial treatment of gonorrhoea – the rapidly evolving Neisseria gonorrhoeae continues to challenge. BMC Infectious Diseases.

Unemo, M., & Shafer, M. (2014). Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae in the 21st Century : Past , Evolution , and Future, 27(3), 587–613.

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. a, Robinson, T. P., *et al.*, (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (16)

Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management (2015), 40(4), 277–83.

Viehman, J. A., Nguyen, M. H., & Doi, Y. (2014). Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii infections. Drugs, 74(12), 1315–1333.

Vincent, J.-L., Bassetti, M., François, B., Karam, G., Chastre, J., Torres, A *et al.*, (2016). Advances in antibiotic therapy in the critically ill. Critical Care, 20(1), 133.

Von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., Van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., Van Alphen, L. B., *et al.*, (2016a). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. Frontiers in Microbiology.

WHO. (2014a). Antimicrobial resistance. Bulletin of the World Health Organization, 61(3), 383–94.

WHO. (2014b). Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. Bulletin of the World Health Organization, 61(3), 383–94.

WHO. (2014c). The role of pharmacist in encouraging prudent use of antibiotics and averting antimicrobial resistance: a review of policy and experience. World Health Organisation, 57.

WHO. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. World Health Organisation, 28.

WHO. (2016). WHO Guidelines for the Treatment of Neisseria gonorrhoeae, 50.

World Health Organization. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance.

WHO Press, 1–28.