



Ana Raquel Fernandes Barrocas

Epidemiologia das beta-lactamases CTX-M, em bactérias Gram negativo, em Portugal

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Raquel Fernandes Barrocas

Epidemiologia das beta-lactamases CTX-M, em bactérias Gram negativo, em Portugal

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Gabriela Conceição Duarte Jorge Silva e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Raquel Fernandes Barrocas, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011147577, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 14 de julho de 2016.

(Ana Raquel Fernandes Barrocas)

Agradecimentos

Agradecer aos meus pais, Antónia e Carlos, pelo apoio incondicional, os valores transmitidos e pelo esforço que fizeram para que eu completasse os meus estudos.

Obrigada, a vós vos devo tudo o que sou hoje.

À minha irmã, Carla Barrocas, por ter sido sempre um modelo a seguir e por todo o apoio e conselhos.

À minha avó Júlia, pelo exemplo de vida lutador que me transmitiu.

Aos meus amigos e ao Jorge Silva, pela presença nos momentos mais difíceis, mas também nos momentos mais vitoriosos.

À Professora Doutora Gabriela Silva pela orientação, disponibilidade e apoio prestado.

Por último, a Coimbra, a cidade que me viu crescer.

A Tutora da Monografia

(Professora Doutora Gabriela Silva)

A Aluna

(Ana Raquel Fernandes Barrocas)

Abreviaturas

CDC - Center for Disease Control and Prevention

CDDEP - Center for Disease Dynamics, Economics and Policy

ECDC - European Centre for Disease Control and Prevention

ESBL - Beta-lactamases de largo espectro (“Extended Spectrum Beta-Lactamases”)

CMI - Concentração mínima inibitória

NAG - Ácido N-acetilglucosamina

NAM - Ácido N-acetilmurâmico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBP - Proteínas de ligação à penicilina (“Protein Binding Penicillin”)

SI - Sequência de inserção

ST - Sequência tipo (“Sequencing type”)

Resumo

A resistência aos antibióticos é um problema alarmante e preocupante. Com o incorreto uso dos mesmos, as bactérias têm-se tornados resistentes por vários mecanismos. Relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos, a classe mais utilizada, a resistência dá-se essencialmente por produção de beta-lactamases. De entre uma enorme variedade destas enzimas, são as beta-lactamases de largo espectro (ESBLs) que merecem especial atenção uma vez que são responsáveis pela ineficácia das cefalosporinas de terceira geração, o que levou a uma mudança da terapêutica empírica de algumas infeções por bactérias Gram negativo. Dentro das ESBLs, as cefotaximases (CTX-M) têm provado ser as mais bem-sucedidas em termos de evolução e epidemiologia. Originado de *Kluyvera* sp., o gene bla_{CTX-M} , associado a elementos genéticos móveis e a estirpes de bactérias multirresistentes como *Escherichia coli* ST131, é o responsável pela produção de CTX-M. Várias mutações neste gene, originam toda a diversidade destas enzimas, que se propagaram a um ritmo bastante acelerado, encontrando-se disseminadas por todo o mundo. A presente monografia fará uma compilação de dados disponíveis até ao momento sobre as CTX-M, com foco na estrutura, classificação e epidemiologia das mesmas.

Abstract

Antibiotic resistance is an alarming and worrying problem. With incorrect usage of antibiotics, the bacteria have been developing resistant by various mechanisms. For beta-lactam antibiotics, the most widely used class, resistance occurs primarily by production of beta-lactamases. From a huge variety of these enzymes, the extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) deserve special attention since they are responsible for the ineffectiveness of the third-generation cephalosporins, which led to a change of empirical therapy of some Gram negative bacteria infections. Within the ESBLs, the cefotaximases (CTX-M) have proven to be the most successful in terms of evolution and epidemiology. Originated from *Kluyvera* sp., the bla_{CTX-M} gene, associated with mobile genetic elements and strains of multiresistant bacteria such as *Escherichia coli* ST131, is responsible for producing CTX-M. Several mutations in this gene originates the diversity of these enzymes, which is propagated at a very rapid pace, being widespread worldwide. This undergraduate thesis will make a compilation of available data to date on the CTX-M, focusing on their structure, classification and epidemiology.

Índice

Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	9
1. Introdução.....	10
2. Antibióticos beta-lactâmicos.....	11
3. Resistência aos antibióticos beta-lactâmicos	14
3.1. Origem da resistência.....	14
3.2. Mecanismos de resistência	15
3.2.1. Alteração da permeabilidade da membrana externa em bactérias Gram-negativo.....	15
3.2.2. Bombas de efluxo.....	16
3.2.3. Alteração do alvo.....	16
3.2.4. Hidrólise do antibiótico.....	16
4. Beta lactamases	17
4.1. Denominação e Classificação	17
4.2. Beta-lactamases de largo espectro.....	18
5. Beta-lactamases CTX-M.....	20
5.1. Origem e disseminação.....	20
5.2. Base molecular da atividade catalítica das CTX-M.....	21
5.3. Epidemiologia.....	23
5.3.1. No mundo.....	23
5.3.2. Em Portugal	26
6. Conclusão.....	28
7. Bibliografia	30
8. Anexos.....	34

Índice de Figuras

Figura 1: Mecanismo de ligação entre ácidos N-acetilmurâmicos.	13
Figura 2: Esquema da entrada dos antibióticos em bactérias Gram positivo e Gram negativo respetivamente.	14
Figura 3: Modo de ação das serino-beta-lactamases e das metalo-beta-lactamases respetivamente.	17
Figura 4: Vários grupos de beta-lactamases CTX-M.	20

Índice de Tabelas

Tabela 1: Classes, subclasses e estrutura molecular dos grupos de antibióticos beta-lactâmicos.	12
Tabela 2: Classificação das beta lactamasases.	19
Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias para várias CTX-M.	22

I. Introdução

As infeções bacterianas eram, na era pré-antibiótica, a principal causa de morte. Com a descoberta dos antibióticos o paradigma mudou, tornando estas doenças totalmente controláveis e combatíveis, sendo as doenças cardiovasculares as principais causadoras de morbidade e mortalidade no Mundo. Recentemente, segundo o Centre for Disease Prevention and Control (CDC, 2015), devido ao uso excessivo, inapropriado e irracional dos antibióticos, tem-se assistido à chamada ‘resistência bacteriana’ que tem exigido mudanças na terapêutica empírica e necessidade de evolução e descoberta de antibióticos.

A penicilina foi o primeiro antibiótico comercializado, e foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming. Enquanto não era distribuído pelo público em geral foi usado na segunda guerra mundial e foi considerado ‘milagroso’ devido ao seu poder de curar infeções. A partir daí as pessoas criaram uma falsa expectativa relativamente às doenças infecciosas, achando que estariam para sempre controladas. Poucos anos após o uso da penicilina, começaram a aparecer estirpes de bactérias resistentes à mesma. Na verdade, quando Fleming ganhou o prémio Nobel, ele logo alertou que as bactérias um dia se poderiam tornar resistentes à penicilina (CDC, 2015).

Assim, apesar da resistência aos antibióticos não ser um novo problema, está a tornar-se mais perigosa e urgente e hoje constitui um problema de saúde pública. Muitas infeções são agora mais dificilmente tratadas, podendo ocorrer maior mortalidade e morbidade. Além disto há um aumento dos custos de saúde, contribuindo para a dívida pública. Segundo o European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC, 2015) morrem 25.000 pessoas anualmente na Europa devido a resistências bacterianas e os custos de saúde rondam os 1.5 mil milhões de Euros.

A resistência bacteriana resulta inevitavelmente e naturalmente do processo do uso dos antibióticos. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011), 65% das pessoas tomaram antibióticos nos últimos 6 meses e 35% no último mês, contudo tem tendência a aumentar com comportamentos e práticas humanas incorretas que se podem resumir em três pontos:

1. Uso abusivo: o antibiótico é usado para prevenir uma certa infeção.
2. Uso insuficiente: quando os doentes não terminam o tratamento.
3. Uso inadequado: quando é receitado um antibiótico na falta de um meio de diagnóstico (sem saber qual a bactéria em causa), resultando no uso em situações incorretas. Além disto, o uso de antibióticos em doses subterapêuticas para crescimento e profilaxia de

doenças em animais na indústria alimentar, a falta de qualidade das indústrias farmacêuticas (produzem antibióticos com concentrações não coincidentes com o definido) e o pobre acesso a medicação em países subdesenvolvidos (levando a que as terapêuticas não sejam levadas até ao fim) contribui para o problema global da resistência (OMS, 2011).

Devido ao problema atual e preocupante, a presente monografia tem como objetivo abordar a resistência bacteriana, especificamente relativamente aos antibióticos beta-lactâmicos e o mecanismo de resistência mais comum, a produção de beta-lactamases. Para isso, numa primeira parte abordar-se-á os mecanismos de resistência em geral, e de seguida haverá um foco nas beta-lactamases, nomeadamente beta-lactamases de largo espectro (ESBLs), e por fim, incidirá na ESBL do tipo CTX-M, que são as mais disseminadas e alarmantes.

2. Antibióticos beta-lactâmicos

Para compreender o mecanismo e o conceito de resistência deve-se conhecer primeiro a estrutura e mecanismo de ação dos antibióticos beta-lactâmicos. Os antibióticos atuam contra as bactérias interferindo com processos essenciais à multiplicação e sobrevivência. Podem ser classificados em inibidores da síntese da membrana citoplasmática, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, inibidores da síntese proteica e inibidores da síntese da parede celular. Esta última é executada pelos beta-lactâmicos, atuando na fase membranar (MIMS *et al.*, 1993).

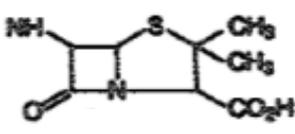
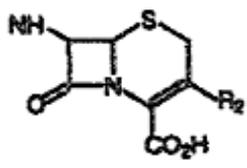
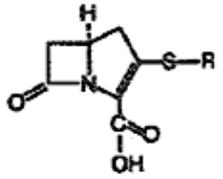
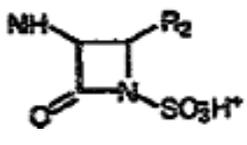
Os antibióticos beta-lactâmicos não são um grupo homogêneo na sua estrutura química, nem nos seus efeitos e indicações terapêuticas, contudo têm a característica comum de serem constituídos estruturalmente pelo anel beta-lactâmico, que lhes dá o nome. Este anel é constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio com radicais substituintes. Este anel é obtido da cultura de *Penicillium chrysogenum*, podendo apresentar-se isolado ou conjugado com outro anel (SOUSA, 2005; PFALLER *et al.*, 2013).

As penicilinas surgem como um exemplo no qual o anel beta-lactâmico se encontra unido a um anel de tiazolidina, enquanto nas cefalosporinas o anel encontra-se associado a um anel de dihidrotiazina. A classe dos carbapenemos exhibe uma cadeia lateral hidroxietil associada ao anel beta-lactâmico e o átomo de enxofre foi substituído por um carbono e uma dupla ligação. Os monobactâmicos só têm o anel beta-lactâmico e a particularidade de possuírem a molécula 2-oxoazetidina-1-sulfónico (Tabela 1). De uma forma geral, as

substituições de radicais originam diferentes propriedades e espectros de ação dos beta-lactâmicos (SOUSA, 2005; PFALLER *et al.*, 2013).

Dentro do grupo existem moléculas com espectro reduzido (por exemplo flucloxacilina), espectro alargado (por exemplo ceftriaxona), atividade contra *Pseudomonas* sp. (por exemplo ceftazidima) e atividade contra anaeróbios estritos (por exemplo imipenem) (SOUSA, 2001).

Tabela 1: Classes, subclasses e estrutura molecular dos grupos de antibióticos beta-lactâmicos. (Adaptado de (SOUSA, 2005; PFALLER *et al.*, 2013)).

Classe	Subclasse	Exemplo	Molécula base
<u>Penicilinas</u>	Penicilinas	Penicilina	
	Aminopenicilinas	amoxicilina, ampicilina	
	Ureidopenicilinas	piperacilina ticarcilina	
	Carboxipenicilinas	cloxacilina, oxacilina	
	Penicilinas resistentes às penicilinases	Meciliname	
	Amidinopenicilina	-	
<u>Cefalosporinas</u>	Cefalosporinas 1ª geração	cefalotina, cefazolina	
	Cefalosporinas 2ª geração	Cefuroxima	
	Cefalosporinas 3ª geração	cefotaxima, ceftazidima	
	Cefalosporinas 4ª geração	Cefepima	
<u>Carbapenemes</u>	-	Ertapenem, imipenem	
<u>Monobactâmicos</u>	-	Aztreonam	

Como referido, os antibióticos beta-lactâmicos interferem com a síntese da parede celular. O peptidoglicano é o maior constituinte da parede de bactérias e não se encontra em eucariotas. A estrutura elementar deste composto é uma cadeia que consiste em moléculas de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) alternadas. Estas cadeias são por sua vez ligadas entre si por pontes de aminoácidos que promovem a ligação entre NAMs. Estas pontes são pentapéptidos compostos por L-alanina, ácido D-glutâmico, L-lisina, D-alanina e D-alanina (Figura 1)

Nas bactérias Gram negativo a ligação interpeptídica localiza-se entre o grupo amina da L-lisina e do grupo carboxilo da D-alanina. Esta reação é uma transpeptidação que é catalizada por enzimas específicas, a transpeptidase, carboxipeptidase, endopeptidase, também chamadas proteínas de ligação da penicilina (PBPs). Estas quando se ligam ao aminoácido formam o complexo enzima-acil-D-alanil e promovem a eliminação do terminal da D-alanina (SOUSA, 2005; PFALLER *et al.*, 2013).

Os antibióticos beta-lactâmicos inibem irreversivelmente as PBPs. Este mecanismo é explicável dada a analogia da molécula da penicilina com a porção terminal D-alanina-D-alanina, da cadeia peptídica do peptidoglicano. Daqui resulta a inibição da formação do peptidoglicano. Se a ligação for à PBPI ocorre lise celular, se for à PBP2 produzem-se células gigantes esféricas e se for à PBP3 ocorre filamentação (GEORGOPAPADAKOU, 1993). A ligação a algumas destas PBPs ou a todas é condição fundamental para que ocorra a inibição do crescimento e autólise celular.

Os antibióticos beta-lactâmicos têm então ação bacteriostática e indiretamente causam autólise celular, sendo também bactericidas. Outra particularidade é que só são ativos contra bactérias em crescimento (SOUSA, 2005; PFALLER *et al.*, 2013).

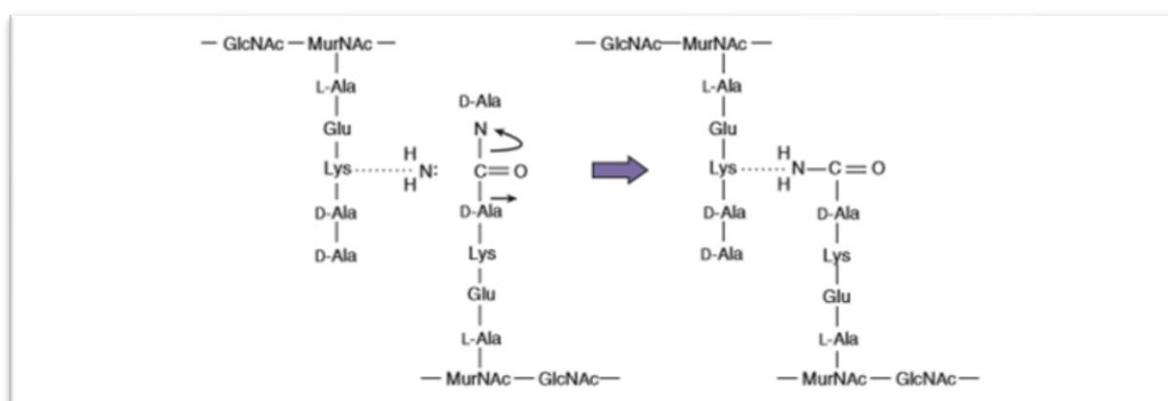


Figura 1: Mecanismo de ligação entre ácidos N-acetilmurâmicos. (Adaptado de (PFALLER *et al.*, 2013)).

A entrada destes antibióticos na célula bacteriana está diretamente relacionada com a parede celular, estrutura e composição, o que difere nas bactérias Gram positivo para as Gram negativo (SOUSA, 2005).

Nas bactérias Gram positivo o peptidoglicano e os ácidos lipoteicóicos são os principais constituintes da parede celular e a membrana citoplasmática está justaposta. É nesta membrana, no folheto externo que se encontram as PBPs (SOUSA, 2005).

Nas bactérias Gram negativo, a parede é muito mais complexa. A parede celular apresenta-se mais estratificada, sendo constituída por camadas de lipopolissacarídeos e

fosfolípidos (membrana externa), onde se inserem poros constituídos por proteínas (as porinas) sobre a qual se encontra a camada de peptidoglicano. Entre esta camada e a membrana citoplasmática confina-se o espaço periplásmico. É no folheto externo da membrana citoplasmática que se localizam as PBPs (SOUSA, 2005).

Assim, nas bactérias Gram positivo os antibióticos têm livre acesso às PBPs, colocando-se apenas o problema do ácido lipoteicoico ser inibidor da atividade autolítica endógena. Esta inibição parece ser devida à formação de micelas que funcionam de barreira entre a autolisina e o peptidoglicano. Nas bactérias Gram negativo a membrana externa poderá representar uma barreira de permeabilidade (Figura 2) (SOUSA, 2005).

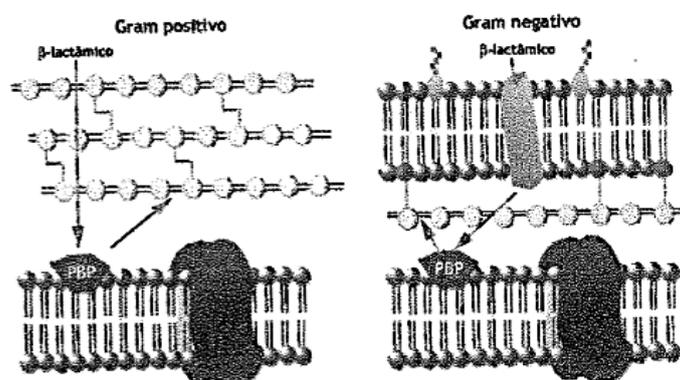


Figura 2: Esquema da entrada dos antibióticos em bactérias Gram positivo e Gram negativo respetivamente. (Adaptado de (SOUSA, 2005)).

Esta classe de antibióticos foi pioneira e ainda hoje é bastante usada. A nível mundial países como Arábia Saudita, França, Espanha e Estados Unidos são os maiores consumidores de penicilinas de largo espectro, segundo o Center for Disease Dynamics, Economics and Policy (CDDEP, 2010).

Na Europa países como França, Itália, Roménia e Bélgica lideram o consumo.

Em Portugal, esta classe é a mais consumida, representando 64% do consumo total de antibióticos em 2014 e dentro desta, são as penicilinas conjugadas com inibidores de beta-lactamases os mais usados (ECDC, 2015).

3. Resistência aos antibióticos beta-lactâmicos

3.1. Origem da resistência

A resistência aos antibióticos foi evoluindo como um processo natural do uso dos antibióticos. Pode ser dividida entre resistência intrínseca ou resistência adquirida. A resistência intrínseca é quando a bactéria tem uma defesa inata, e é uma característica de toda a espécie. Esta característica pode ser observada nas bactérias Gram negativo que são intrinsecamente resistentes aos antibióticos vancomicina e teicoplanina. Tal facto deve-se ao

elevado peso molecular destas moléculas, o que impede a sua difusão através dos canais de porinas (MIMS *et al.*, 1993). A resistência adquirida é quando a bactéria não tinha inicialmente a resistência, mas adquiriu-a por mutação e/ou transferência de genes:

1- Mutação: ocorre uma mutação cromossomal (deleção, inversão, inserção) espontânea numa bactéria que resulta numa proteína alterada. Na presença de antibióticos estas bactérias sobrevivem em relação as outras e multiplicam-se, originando uma nova estirpe de bactérias. O gene mutado é tanto mais disseminado quando maior a divisão da bactéria, sendo, portanto, dependente do crescimento desta.

2- Transferência de genes: A bactéria não resistente pode adquirir novos genes por transformação (a bactéria incorpora no seu DNA moléculas de DNA livres no meio), transdução (por meio de um bacteriófago) ou por conjugação (a bactéria resistente transfere o seu plasmídeo a outra). Os genes de resistência podem estar presentes em plasmídeos, transposões e/ou integrões. Os plasmídeos têm alta capacidade de replicação, facilitando o processo de transferência de genes de resistência. Os transposões, chamados genes “saltantes”, podem mover-se do cromossoma para o plasmídeo permitindo a disseminação mais rápida do gene de resistência ou podem passar de plasmídeos não transmissíveis para transmissíveis, permitindo a disseminação. Os integrões são genes que são integrados numa certa região alvo por ação dum integrase que por sua vez podem estar inseridos em transposões (MIMS *et al.*, 1993; PFALLER *et al.*, 2013).

Quando a transferência de genes se dá entre espécies ou estirpes diferentes denomina-se por transferência horizontal. Por vezes pode dar-se a transferência de mais do que um gene, originando resistências a várias classes de antibióticos, as bactérias multirresistentes (NORMARK E NORMARK, 2002).

3.2. Mecanismos de resistência

As bactérias escapam ao efeito bactericida dos antibióticos beta-lactâmicos essencialmente por quatro mecanismos:

3.2.1. Alteração da permeabilidade da membrana externa em bactérias Gram-negativo

A maioria dos antibióticos devido ao seu peso molecular, neutralidade e hidrofília compatíveis com os canais de porinas conseguem atingir o seu local de ação. Uma diminuição da permeabilidade ou mesmo uma impermeabilização da membrana externa poderá levar a resistências. Este fato acontece devido a mutações nos genes que codificam as

porinas, podendo levar a uma perda ou alteração da função. Por exemplo algumas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* modificam ou eliminam os seus canais OprD de porinas, levando à resistência a carbapenemos (SOUSA, 2005; PFALLER *et al.*, 2013).

3.2.2. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de transporte transmembranar que expulsam para fora da célula substâncias tóxicas. Um aumento da eficiência da bomba de efluxo ou o aumento do número de bombas de efluxo, leva a uma diminuição da concentração de antibiótico no interior da bactéria. Este mecanismo sozinho não confere resistência a antibióticos, mas em combinação com outros pode levar à falência terapêutica (MIMS *et al.*, 1993; PFALLER *et al.*, 2013).

3.2.3. Alteração do alvo

Uma modificação das PBPs é um dos mecanismos de resistência. Este mecanismo processa-se por um de quatro mecanismos: 1. substituição de aminoácidos, que promove a diminuição da afinidade entre antibiótico e PBP; 2. aquisição de novas PBPs; 3. existência de proteínas resultantes da recombinação entre genes que codificam PBP's associadas à expressão de suscetibilidade e PBP's que conduzem à resistência ao antibiótico; 4. hiperprodução da proteína com conseqüente aumento do nível de resistência aos antibióticos β -lactâmicos (GEORGOPAPADAKOU, 1993). Este mecanismo assume especial significado em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* por resistência à metilina e penicilina respetivamente (SOUSA, 2005).

3.2.4. Hidrólise do antibiótico

Os antibióticos ao entrarem na célula podem ser hidrolisados por enzimas plasmídicas ou cromossómicas, as beta-lactamases. Estas catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico (ligação CO-N) originando um produto inativo.

Algumas beta-lactamases utilizam iões zinco para quebrar o anel beta-lactâmico, as metalo-beta-lactamases e outras utilizam a via éster-serina, as serino-beta-lactamases.

As serino-beta-lactamases associam-se primeiramente ao antibiótico de forma não-covalente formando o complexo não covalente *Michaelis*. Posteriormente o anel é atacado pelo hidroxilo livre da cadeia lateral de um resíduo serina do sítio ativo da enzima, originando um acil-éster covalente. A posterior hidrólise deste éster liberta a enzima, que se

encontra ativa e disponível para lisar mais moléculas de antibióticos, enquanto que o antibiótico se encontra hidrolisado e inativo (LIVERMORE, D., 1995).

As metalo-beta-lactamases não formam o intermediário peniciloilenzima, fazendo ataque direto ao anel beta-lactâmico (Figura 3).

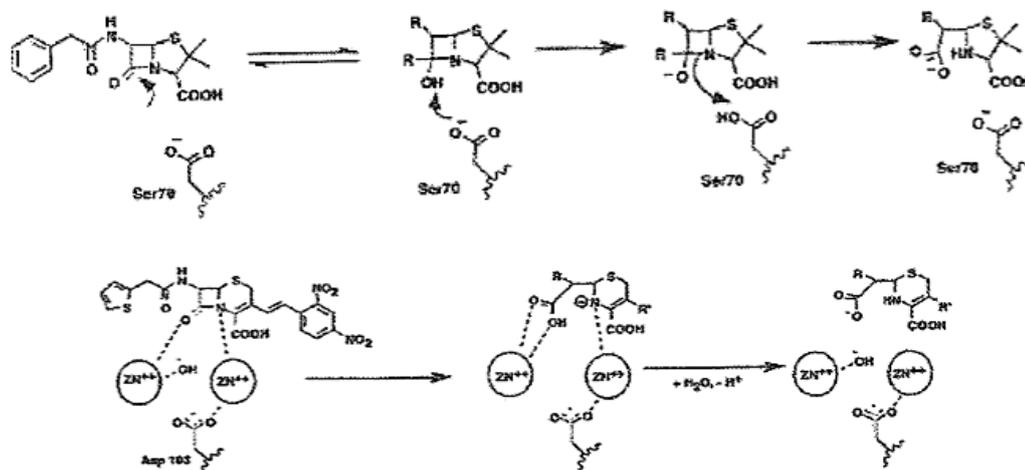


Figura 3: Modo de ação das serino-beta-lactamases e das metalo-beta-lactamases respetivamente. (Adaptado de (SOUSA, 2005)).

Nas bactérias Gram negativo as beta-lactamases encontram-se no periplasma, acumulando-se e atingindo elevadas concentrações que hidrolisam os antibióticos. Nas Gram positivo, as enzimas são excretadas para o meio exterior (SOUSA, 2005).

Nas bactérias Gram positivo o principal mecanismo é a alteração de PBPs e nas Gram negativo é a hidrólise do antibiótico (RICE, 2012).

4. Beta-lactamases

A primeira beta-lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain em *E. coli*, antes da utilização terapêutica da penicilina (SOUSA, 2005). A partir daí várias beta-lactamases foram sendo descobertas, e em 25 de julho de 2011 o número de beta-lactamases listadas era de 927 (RICE, 2012).

4.1. Denominação e Classificação

A denominação das beta-lactamases é feita consoante o nome do doente em que foram isoladas (TEM: doente grega Temoniera), de acordo com o seu substrato (OXA, ativa contra oxacilina), pelas suas propriedades bioquímicas (CTX, maior atividade contra

cefotaxima) ou pelo nome do hospital em que foram isoladas (MIR, hospital Miriam) (SOUSA, 2005).

A classificação foi inicialmente de acordo com o perfil do substrato (penicilases, cefalosporinases, etc.). Em 1980 Ambler agrupou-as em quatro classes (A, B, C e D) de acordo com a sequência de aminoácidos. A Classe A são as serino-beta-lactamases, a classe B são as metalo-beta-lactamases dependentes de zinco, a classe C são beta-lactamases cromossômicas e a D são as oxacilinas (SOUSA, 2005).

Em 1995, BUSH, JACOB e MEDEIROS (1995) propõem uma nova classificação que relaciona o perfil do substrato e dos inibidores com a sua estrutura molecular. Esta classificação é feita em quatro grupos (1, 2, 3 e 4) O grupo 1 são as cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico, o grupo 2 são beta-lactamases que são inibidas por inibidores das beta-lactamases e pertencem ao grupo A ou D de Ambler, o grupo 3 são as metalo-beta-lactamases que são pobremente inibidas por inibidores exceto o EDTA e o p-cloromercuribenzoato e o grupo 4 são as penicilinas que não são inibidas pelo ácido clavulânico. Em 2009, BUSH e JACOBY (2010) fizeram uma atualização nos subgrupos devido à crescente identificação e expansão das famílias de beta-lactamases (Tabela 2).

4.2. Beta-lactamases de largo espectro

As ESBLs são definidas como as enzimas produzidas por certas bactérias que são capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro alargado, como ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima e oximinomonobactâmio. Os carbapenemos e as cefamicinas são efetivos contra bactérias produtoras destas enzimas e no geral as ESBLs são inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam (GHAFOURIAN *et al.*, 2013).

A primeira foi identificada na Europa em 1980 sendo inicialmente frequentes em *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae* e agora são observadas em outras enterobactérias. A maior incidência ocorre em ambiente hospitalar devido ao uso de cefalosporinas de largo espectro, os antibióticos de primeira linha em muitas infeções (SOUSA, 2005).

As enzimas consideradas com características ESBL são principalmente as TEM, SHV, OXA e as CTX-M. São encontradas em *Enterobacteriaceae* e em não fermentadores como *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. e resultam de uma mutação do gene *bla* na região que codifica TEM-1, -2, SHV-1 e OXA-10. Estas enzimas não hidrolisam cefalosporinas de 3ª geração e quando mutadas originam as ESBLs.

Tabela 2: Classificação das beta lactamases. (Adaptado de (BUSH E JACOBY, 2010)).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams	GCI, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiprome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxymino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CcpA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

Existe um grupo de ESBLs com grande importância, as cefoxatimases (CTX-M). Estas são cefalosporinases naturais e rapidamente se espalharam por muitas espécies sendo a classe mais disseminada e a principal causadora de bactérias resistentes às terapêuticas existentes e por isso as mais importantes de caracterizar (SRIDHAR, 2012; LIEBANA *et al.*, 2013).

As SHV, TEM e as CTX-M contêm serina no local ativo e pertencem à classe A de Ambler (SOUSA, 2005) e ao grupo funcional 2be. As OXA pertencem à classe D e grupo funcional 2d (SRIDHAR, 2012).

5. Beta-lactamases CTX-M

5.1. Origem e disseminação

A primeira cefotaximase a ser identificada veio de *E.coli* isolada de uma criança de quatro meses em Munique, Alemanha em 1989. Foi chamada CTX-M-I por ser cefotaximase e M de Munique. A partir daqui a variedade destas enzimas cresceu exponencialmente e atualmente estão divididas em 6 grupos (Figura 4) de acordo com a sequência aminoácida que diferem em >10% entre cada grupo e dentro de cada grupo diferem <5% (D'ANDREA et al., 2013; LAHLAOUI et al., 2014).

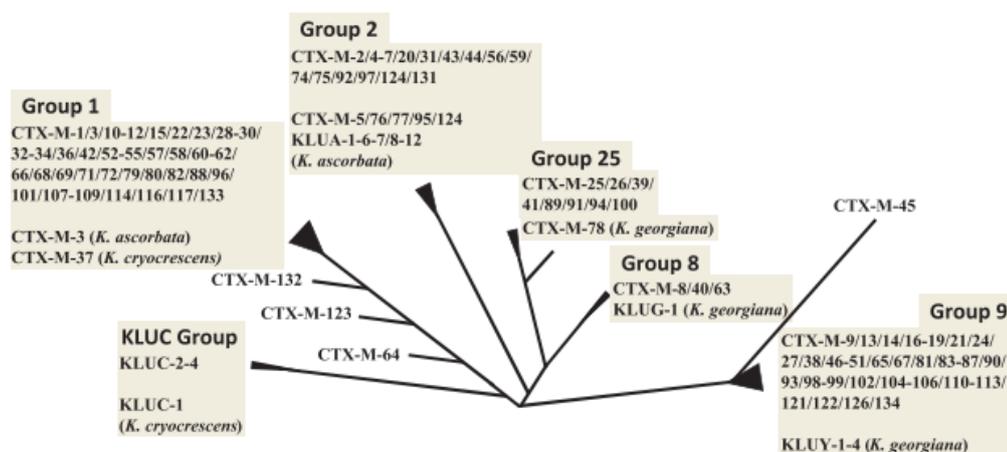


Figura 4: Vários grupos de beta-lactamases CTX-M. (Adaptado de (D'ANDREA et al., 2013)).

São codificadas pelo gene bla_{CTX-M} que codifica 291 aminoácidos diferentes e apenas uma alteração num aminoácido pode levar a um novo aparecimento de uma nova CTX-M. A maior parte destas enzimas são ativas contra cefotaxima e ceftriaxona mas não tanto para a ceftazidima. Ao contrário das TEM e SHV, são originadas dos genes bla cromossómicos de *Kluyvera spp* (bactéria ambiental, microbiota comensal do intestino humano, e muito raramente patogénio oportunista) que se mobilizaram para os plasmídeos. Plasmídeos conjugativos com bla_{CTX-M} foram adquiridos por bactérias patogénicas oportunistas como por exemplo *E.coli*. Subsequentes mutações nestes genes originaram a diversificação da família. Eventos de recombinação genética também podem ter contribuído para o aparecimento de novas CTX-M (SRIDHAR, 2012).

A presença de um forte promotor *upstream* ao gene bla resulta na elevada expressão de CTX-M. Acredita-se que sequências de inserção (SI) serão as responsáveis pelo aparecimento deste promotor. Várias SI foram identificadas, sendo a ISEcpI a mais

disseminada e localizada na posição 42-266bp, associada a quase todas as classes de CTX-M, exceto a classe CTX-M-8 (SRIDHAR, 2012).

Também associados à resistência bacteriana estão os elementos integrativos e conjugativos. Não são estruturas homogêneas e incluem transposões conjugativos ou os plasmídeos conjugativos integrativos que aparecem tanto em bactérias Gram positivo como em negativo. Têm a possibilidade de passar entre cromossomas (através de um bacteriófago por exemplo) ou de passar entre plasmídeos por conjugação.

Os plasmídeos que transportam os genes bla_{CTX-M} são geralmente os IncFII, que estão bastante distribuídos nas enterobactérias pelo mecanismo de conjugação e normalmente transportam também genes de resistência aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. São os chamados 'Plasmídeos pandémicos de resistência' (SRIDHAR, 2012).

Entre a sequência de inserção e o gene há os espaçadores, que produzem diferentes tamanhos de espaços e pensa-se que estejam relacionados com diferentes expressões do gene. Além disto, o gene $bla_{CTX-M-10}$ tem sequências relacionadas com fagos, o que poderá indicar a importância de bacteriófagos para a diversidade de enzimas CTX-M, ou seja, da transdução (CANTON *et al.*, 2012).

A disseminação das CTX-M a nível mundial deve-se à participação específica de clones de *E.coli* e *K.pneumoniae* que transportam o plasmídeo com os genes bla_{CTX-M} – os chamados 'clones de alto risco'. A estirpe de *E.coli* mais envolvida pertencente à sequência tipo (ST) 131 e está associada à disseminação de CTX-M tanto na comunidade como em ambiente hospitalar (SRIDHAR, 2012).

Apesar de haver casos de existência dos genes bla_{CTX-M} em não-enterobactérias, estes são esporádicos e bastante isolados, sugerindo que estas espécies não contribuíram para a disseminação dos mesmos (D'ANDREA *et al.*, 2013).

5.2. Base molecular da atividade catalítica das CTX-M

Foram descritas até hoje 150 formas polimórficas das CTX-M. Algumas destas formas aumentam o espectro hidrolítico enquanto que outras não favorecem a ligação a antibióticos (LAHLAOUI *et al.*, 2014).

Os resíduos de Ser237 e Arg276 trabalham em conjunto para a atividade de cefotaximase e menos para a atividade de benzilpenicilinase. Estes contribuem para a formação de pontes de hidrogénio com o grupo carboxil C4, com o anel tiazolídico e com grupo metil acetato da cefotaxima. Estes resíduos também contribuem para a quebra da ligação de hidrogénio entre Asn170 e Asp240 que é responsável pela expansão do sítio ativo

da enzima o que permite o correto posicionamento da cefotaxima de modo a ocorrer a atividade catalítica. Assim, são estes resíduos que principalmente diferem as CTX-M das TEM e das SHV uma vez que estas não possuem atividade para a cefotaxima (ADAMSKI *et al.*, 2015).

Mais tarde, novas mutações foram surgindo pela pressão associada ao consumo da ceftazidima e o espectro hidrolítico das CTX-M foi alterando. As mutações D240G e P167S ou D240G e L169Q contribuem para o aumento da atividade contra a ceftazidima. A D240G esta localizada no fundo na cadeia B3 e é responsável pelo aumento da flexibilidade e aumento da cavidade onde se insere a molecula de antibiótico. A P167S e L169Q estão localizada no ‘omega loop’ da enzima e altera interações com a ceftazidima (Tabela 3). Contudo, estas mutações levam a um decréscimo da atividade contra a cefotaxima, o que pode ser revertido pela mutação A77V (Tabela 3). Esta atua por estabilização da enzima, revertendo os defeitos causados pelas mutações descritas anteriormente. (D’ANDREA *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2015).

Mutações em S130G, K234R, S237G tornam as CTX-M resistentes aos inibidores mas menos efetivas contra as cefalosporinas (D’ANDREA *et al.*, 2013).

Assim, haverá CTX-M mais específicas para cefotaxima como CTX-M-3, outras para ceftazidima como CTX-M-58 e outras com atividade para ambas como CTX-M-52.

Daqui, resulta mais uma vez a necessidade de realçar o uso de um bom diagnóstico porque ser uma CTX-M não significa que seja (apenas) resistente a cefotaxima.

Tabela 3: Concentrações mínimas inibitórias (CMI) para várias CTX-M. (Adaptado de:(D’ANDREA *et al.*, 2013)).

Enzyme	MIC (mg/L)		
	Cefotaxime	Cefepime	Ceftazidime
<i>CTX-M-1 group</i>			
CTX-M-3	256	32	1
CTX-M-15 (CTX-M-3/D240G)	128	1	2
CTX-M-62 (CTX-M-3/P167S)	1	0.50	32
CTX-M-3/A77V ^a	128	1.5	1
CTX-M-55/57 (CTX-M-3/A77V + D240G)	>256	4	2
CTX-M-52 (CTX-M-3/A77V + P167S)	4	0.25	32
CTX-M-3/N106S ^a	3	1.5	0.50
CTX-M-3/N106S + P167S ^a	3	1.5	32
CTX-M-33 (CTX-M-3/N106S + D240G)	>256	8	2
CTX-M-1	>256	128	4
CTX-M-32 (CTX-M-1/D240G)	256	4	2
CTX-M-1/P167S ^a	16	4	256
CTX-M-58 (CTX-M-1/P167T)	16	4	256
<i>CTX-M-9 group</i>			
CTX-M-9	16	2	1
CTX-M-16 (CTX-M-9/D240G)	16	2	8
CTX-M-9/P167S ^a	0.5	0.12	8
CTX-M-9/P167S + N106S ^a	0.5	0.12	8
CTX-M-9/L169Q ^a	0.5	0.06	8
CTX-M-27	32	0.50	1.5
CTX-M-93 (CTX-M-27/L169Q)	1	0.12	8
<i>CTX-M-2 group</i>			
CTX-M-2	8	ND	1
CTX-M-2/P167S ^a	2	ND	32

^a Laboratory mutant.

5.3. Epidemiologia

Pode ser dividida em três períodos: o primeiro foi o aparecimento de diferentes CTX-M em diferentes e distantes pontos do globo e ocorreu em meados de 1990. O segundo é caracterizado pelo aparecimento das CTX-M-3, -9, -14 e -15 e ocorreu entre 1994 a 2000. O terceiro período, a partir de 2000 caracteriza-se pela universal dispersão e globalização destas beta-lactamases (CANTON *et al.*, 2012). A primeira década de 2000 assistiu-se a uma explosão da expansão e diversificação das CTX-M, e até hoje já foram identificadas 172 (AZAM *et al.*, 2016). Foram observadas principalmente em *E.coli*, tanto na comunidade como nos hospitais em todo o mundo. Esta época ficou conhecida como ‘pandemia das CTX-M’.

O fator que contribui para a disseminação é principalmente a co-resistência, levando ao ‘capitalismo bacteriano’, ou seja, as bactérias mais resistentes são aquelas que têm oportunidade de se tornarem mais resistentes (LAHLAOUI *et al.*, 2014). Alguns estudos mostram que as viagens internacionais, a migração, o transporte de comida e animais entre países e as migrações dos animais possam ser os responsáveis pela disseminação; contudo outros estudos mostram origens simultâneas de diferentes tipos de CTX-M em locais geograficamente diferentes ao mesmo tempo. Além disto, estudos plasmídicos sugerem que a sua origem é independente um dos outros (CANTON *et al.*, 2012; SRIDHAR, 2012). Estudos indicam que os doentes imunossuprimidos (principalmente aqueles que se encontram internados em hospitais), e aqueles que fizeram tratamento anterior com fluoroquinolonas são os mais suscetíveis a desenvolverem infeções por estirpes resistentes, causando infeções principalmente urinárias, intra-abdominais e pancreáticas-biliares complicadas (PARK *et al.*, 2016).

5.3.1 No mundo

As CTX-M estão por toda a parte, mas a distribuição dos vários grupos não é uniforme e há países mais estudados que outros (Anexo I). No Reino Unido não foi detetada nenhuma CTX-M até 2000. A partir desta data, principalmente em ambiente hospitalar, houve uma deteção exponencial de *E.coli* e *K.pneumoniae* produtoras de CTX-M-9, -14 e -15, sendo, neste país, as beta-lactamases mais comuns. Em França, apenas casos raros foram detetados entre 1989 e 2000, até que em 2001 houve um surto em Paris devido a *E.coli* produtora de CTX-M-15. A partir de 2003, *E.coli* já era a principal causadora de infeções em ambiente hospitalar. Em Espanha, já em 1990 e 1991 se detetaram casos de CTX-M-10 e -9 em *K.pneumoniae* e em *E.coli*. Apesar da emergência precoce, não se

tornaram logo as ESBLs mais prevalentes. Só em 2000, um estudo feito em hospitais por toda a Espanha revelou que *E.coli* transportava principalmente consigo os genes para CTX-M-9, -14 e -10. Enquanto que a -10 era encontrada só em hospitais a norte, a -9 e a -14 estavam por toda a Espanha, em enterobactérias e não enterobactérias. Mais tarde, à semelhança do que aconteceu no resto do Mundo, a CTX-M-15 espalhou-se rapidamente. Outras CTX-M como a -1 e a -32 também foram detetadas. Em Itália, só em 2003 foram reportados casos, incluindo *E.coli* com CTX-M-1 e *K.pneumoniae* com CTX-M-15. A CTX-M-1 foi encontrada em 76% das bactérias portadoras de ESBLs em 2003.

No geral, podemos afirmar que na Europa as CTX-M são endémicas e dominam as CTX-M-15, -1, -14 e -9 (LIVERMORE, D. M. *et al.*, 2007). Relativamente à Europa, os números elevados parecem ter a ver com os reservatórios de água contaminados e aos animais que transportam estas bactérias (WOERTHER *et al.*, 2013).

Estudos feitos recentemente, avaliaram a presença de CTX-M em gaivotas em vários pontos da Europa e é interessante verificar que há semelhanças entre as variantes animais e humanas (STEDT *et al.*, 2015).

Na Ásia e na América do Sul, as CTX-M também são endémicas, encontrando-se em 30 a 90% em *E.coli*. Na Tailândia o grupo 9; na Indonésia a CTX-M-14 e -15; na China a CTX-M-14 e em emergência a -15.

Em África, os países Nigéria e Madagáscar só quase foram reportados casos de CTX-M-15. Na Tunísia e no Egipto encontram-se mais disseminadas as CTX-M-1 e -15; o Sudeste Asiático, o Pacífico Ocidental, Mediterrâneo Oriental e África são as regiões com mais portadores o que pode ser devido ao pobre acesso de água canalizada e tratada, pobreza e elevada densidade populacional (WOERTHER *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos da América, a disseminação foi mais lenta e em 2005 foi quando houve maior número de casos. Hoje em dia, já se encontram bastantes casos de CTX-M-15, onde 91.3% de *E.coli* já são portadoras deste gene (CANTON *et al.*, 2012; HAYAKAWA *et al.*, 2013).

Novas enzimas continuam a aparecer, recentemente foi identificada a CTX-M-152, na Índia no rio Yamuna, que tem alta atividade catalítica para a cefotaxima (AZAM *et al.*, 2016).

As principais bactérias produtoras de CTX-M são *E.coli* e *K.pneumoniae*, causando resistência às cefalosporinas de 3ª geração. (Anexo 2 e 3) Em 2014, 29 países da Europa reportaram 84.016 casos de *E.coli* e 19724 casos de *K.pneumoniae* resistentes a este sub-grupo de antibióticos (Anexo 4 e 5) (ECDC, 2015).

Um caso muito particular é *E.coli* ST131 que é a maior responsável pela alta disseminação de CTX-M-15. De referir que esta enzima possui uma atividade elevada contra cefotaxima e ceftazidima. Assim, além de estudar a disseminação mundial das CTX-M será importante estudar a disseminação de *E.coli* ST131, já referida anteriormente como multirresistente. Esta corresponde ao serótipo O25:H4 ou O16:H5 e pertence ao grupo filogenético B2, geralmente bastante patogénico. *E.coli* ST131 foi descrita inicialmente só em 2008 em apenas três continentes (América do Norte, Europa e Ásia) e hoje é reportada em todo o mundo associada principalmente à produção de ESBLs e resistência às fluoroquinolonas (Anexo 6) (BAJAJ *et al.*, 2016).

É mais resistente à amicacina e mais frequentemente resistente à amoxicilina/ác.clavulânico, piperacilina-tazobactam, ciprofloxacina contudo mais suscetível à gentamicina e co-trimoxazole que *E.coli* não-ST131. É produtora de TEM-1 e -2, SHV-1, OXA-1 e CTX-M, principalmente a -15 mas também já foram documentadas -1, -2, -3, -9, -10, -14, -18, -24, -27, -28, -32, -39, -52, -55, -65 e -103 (NICOLAS-CHANOINE *et al.*, 2014).

Se selecionarmos *E.coli* produtoras de ESBLs, ST131 são as mais prevalentes tendo subido de 22% (dados de Espanha) para 66% (Reino Unido) na Europa entre 2006 e 2011. São as principais causadoras de cistites e pielonefrites em infeções adquiridas na comunidade ou em ambiente hospitalar. É responsável por 34% das infeções do trato urinário (no total de bactérias produtoras de ESBLs) na Suíça (2007 a 2011) e 70% na Índia. No Reino Unido, *E.coli* ST131 é causadora de, infeções por bactérias resistentes à cefpodoxima (ou seja produtoras de ESBL, CTX-M ou não), em 64% dos casos adquiridos na comunidade e 84% dos casos adquiridos em ambiente hospitalar (ROGERS *et al.*, 2011).

Em 2009, 19% de *E.coli* eram ST131 e em 2011 passou para 27% (NICOLAS-CHANOINE *et al.*, 2014).

A transmissão é feita principalmente de pessoa para pessoa ou de animal doméstico para pessoa. *E.coli* ST131 já foi encontrada em animais, alimentos derivados de animal, esgotos, rios e no intestino de humanos, especialmente em viajantes. A disseminação global crê-se ser devida ao alto metabolismo de *E.coli*, sendo capaz de aderir e invadir as células epiteliais do intestino e os macrófagos, produzir biofilmes e à presença dos plasmídeos pandémicos IncF que transportam consigo vários outros genes de resistência (DAUTZENBERG *et al.*, 2016).

5.3.2 Em Portugal

Em Portugal vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos em indivíduos hospitalizados, indivíduos saudáveis, animais e mesmo em sistemas aquáticos de modo a tentar compreender a disseminação das CTX-M no nosso país. A verdade é que Portugal é um dos países da Europa com maior quantidade de produção de ESBLs, principalmente TEM e CTX-M (Anexo 7) (MACHADO *et al.*, 2013).

A primeira deteção de CTX-M foi em 2004, quando se analisou um isolado fecal de um indivíduo saudável, sem exposição nos últimos três meses a antibióticos ou internamento hospitalar. Revelou-se a presença de *E.coli* produtora de CTX-M-14, o que indicou desde cedo a disseminação pessoa-pessoa em Portugal (MACHADO, E. *et al.*, 2004). Outro estudo feito no Norte e Centro do país, com o mesmo perfil de indivíduos que anteriormente, demonstrou que existiam o mesmo tipo de *E.coli* no microbiota comensal (MACHADO *et al.*, 2013).

Um estudo feito com doentes hospitalares no norte e centro de Portugal demonstrou que 39% das bactérias dos isolados fecais dos mesmos eram produtoras de ESBLs sendo 22% destas produtoras de CTX-M. Encontraram-se CTX-M-1, -14 e -15 (MACHADO *et al.*, 2007). Outro estudo semelhante, mas feito no Norte, Sul, Lisboa e Vale de Tejo, revelou que 66% das bactérias dos isolados fecais eram produtores de ESBLs e que 92% eram produtores de CTX-M-15. Também foi encontrado CTX-M-14 (8%) e CTX-M-32 (1%), mas em menor quantidade (MENDONÇA *et al.*, 2007). Outro estudo, mas desta vez analisando pus, exsudatos e urina de doentes hospitalizados num hospital do centro, revelou a presença de CTX-M em 75% dos isolados e uma predominância de *E.coli*. Analisando as CTX-M descobriu-se que as principais eram CTX-M-15 e -1 (AMARAL E MACHADO, 2009).

Ao analisar feridas pós-cirúrgicas em outro estudo, deteta-se que *E.coli* é o membro mais representativo (46%) seguido de *K.pneumoniae* (29%). Setenta e dois por cento dos organismos eram produtores de ESBLs sendo que 98% de *E.coli* eram produtoras assim como 86% de *K.pneumoniae*. Foram descobertas as CTX-M-15 (13%), -1 (3%), -9 (10%) e -14 (7%) (FERNANDES *et al.*, 2010).

Um estudo mais recente na zona Norte, Minho, em indivíduos hospitalizados demonstrou a presença de CTX-M-1, -9, -14, -32, -15 em *E.coli* e -15 em *K.pneumoniae*. sendo a -14 a mais disseminada na zona noroeste (FERNANDES *et al.*, 2014).

Numa outra vertente, analisando animais, nota-se uma clara homologia genética entre CTX-M humanas e animais. Em 2004, foi detetado pela primeira vez a enzima CTX-M-1 num cão doméstico saudável (COSTA *et al.*, 2004). A mesma enzima foi detetada mais tarde em

galinhas e suínos, produzida por *E.coli* (MACHADO *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2010). Em 2006, um estudo feito em 72 isolados fecais de animais selvagens de parques naturais das zonas norte e centro de Portugal (incluindo aves de rapina, corujas, raposas, coelhos, cegonhas, veados, etc.) detetou a presença de CTX-M-14 e -1, apesar de em combinação com os genes TEM (COSTA *et al.*, 2006). Em 2008 um estudo indica que gaivotas na Ilha das Berlengas transportavam consigo *E.coli* (19.3% dos isolados) que produziam CTX-M (27%) sendo identificadas as CTX-M-1, -14 e -32 (POETA *et al.*, 2008). Em 2010, um estudo feito em aves de rapina da Serra da Estrela revelou que 26.9% dos isolados correspondiam à *E.coli* e que destas, 87.5% eram produtoras de CTX-M-1 (PINTO *et al.*, 2010). Em 2015, detetou-se CTX-M-15 em golfinhos da costa portuguesa, produzida por *E.coli* ST131 (MANAGEIRO *et al.*, 2015).

Outro estudo analisando sistemas aquáticos, para onde eram dejetados ilegalmente esgotos, revelou a presença de *E.coli* produtoras de CTX-M-14 e -32 (MACHADO *et al.*, 2009).

Por outro lado, os estudos indicam que o gene bla_{CTX-M} não se encontra sozinho, estando presente frequentemente associado aos genes bla_{TEM} e bla_{OXA} . Além disto, estudos revelam que a enzima TEM é mais frequente em Portugal do que a CTX-M (41% e 33% respetivamente). Relativamente à sequência de iniciação, a mais descrita foi a *ISEcpI* (MENDONÇA *et al.*, 2007; AMARAL E MACHADO, 2009; FERNANDES *et al.*, 2010).

E.coli ST131, como referenciado anteriormente, já foi descrita em Portugal, sendo a responsável pela rápida disseminação da CTX-M-15 que tem decorrido (MANAGEIRO *et al.*, 2015).

Estes estudos por um lado mostram a evolução e a expansão dos vários grupos de CTX-M em Portugal ao longo dos anos, dominando hoje em dia sem dúvida a -14, -15, -1, -9 e -32 o que vai de encontro ao observado no resto da Europa. Por outro lado, observamos a expansão para outros ambientes, como o animal e aquático, o que revela que as bactérias produtoras de CTX-M presentes nos dejetos humanos podem passar para os animais por contato oral-fecal ou permanecer nas águas.

6. Conclusão

A presente monografia permite concluir que o uso dos antibióticos beta-lactâmicos conduziu a uma resistência aos mesmos que se expandiu rapidamente, tanto a nível geográfico uma vez que todos os países acabaram por ser atingidos como a nível bacteriológico uma vez que a resistência passa de espécie para espécie. O assunto é bem real, todos os dias há pessoas a morrer devido a resistências bacterianas e crê-se que o problema continuará a crescer. Medidas deverão ser tomadas de modo a que as bases da nossa medicina atual e que nossa saúde se preserve.

Alguns cientistas acreditam que acima de tudo está o ato de fazer um (bom) diagnóstico. Frequentemente o diagnóstico não é (bem) feito mas a verdade é que se soubermos com o que estamos a lidar será muito mais fácil de atuar especificamente contra a bactéria evitando assim mais complicações para o doente e prevenindo a resistência. Neste contexto, fará também sentido aprimorar as nossas técnicas de diagnóstico, tornando-as menos fastidiosas ou descobrir novas mais práticas e/ou eficazes (BAJAJ *et al.*, 2016).

Por outro lado, a descoberta de novos antibióticos deve ser fomentada. O ritmo do crescimento da resistência é neste momento maior que o ritmo da descoberta de novos antibióticos e para isto a investigação clínica devia ser mais apoiada pelo governo e pelas indústrias. Acredita-se que todos os mecanismos de resistência ainda não estão conhecidos e há quem acredite que estudá-los e desvendá-los poderá ser o primeiro passo para o desenvolvimento de novos antibióticos (CULYBA *et al.*, 2015).

Outros estudos, tentam contornar o problema da resistência aos beta-lactâmicos com os antibióticos já existentes e demonstram que a combinação de dois antibióticos com mecanismos de ação diferentes, poderão combater as resistências. Um dos antibióticos funcionará como 'suicida' ligando-se às beta-lactamases enquanto que o outro exercerá a sua ação (ZAVASCKI *et al.*, 2013).

Contudo, combater a resistência toca a todos e tanto o público em geral, profissionais de saúde, industriais e o governo devem ser sensibilizados para esta questão. Para isso a OMS (2011) propõe algumas medidas de combate tais como: Uso racional e regulamento dos antibióticos, regulamentação para uso animal, prevenir e controlar infeções (vacinas por exemplo), apostar no desenvolvimento de novos antibióticos, criar dados de base com as resistências já conhecidas e realizar ações intersectoriais e multidisciplinares envolvendo a sociedade em geral. Este último ponto é de extrema importância para o farmacêutico dado que são os profissionais de saúde mais especializados no assunto e mais perto do público em geral. Assim, compete-nos a realização de campanhas de sensibilização

e a devida atenção para o problema de modo a identificar casos de resistência, colaborar com a equipa médica e aconselhar o público no modo de atuar, contribuindo assim para a atenuação/solução deste problema.

7. Bibliografia

ADAMSKI, C.; CARDENAS, A.; BROWN, N.; HORTON, L.; SANKARAN, B.; PRASAD, B.; GILBERT, H.; PALZKILL, T. - Molecular basis for the catalytic specificity of the CTX-M extended-spectrum B-lactamases. **Biochemistry**. . ISSN 15204995. 54:2 (2015) 447–457. doi: 10.1021/bi501195g.

AMARAL, S. N.; MACHADO, E. - Characterization of CTX-M-type (ESBL) among *enterobacteriaceae* from a portuguese hospital. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde Porto**. 6:1646-0480 (2009) 254–263.

AZAM, M.; JAN, A. T.; HAQ, Q. M. R. - *bla* CTX-M-152, a Novel variant of CTX-M-group-25, identified in a study performed on the prevalence of multidrug resistance among natural inhabitants of river Yamuna, India. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664-302X. 7:February (2016) 176. doi: 10.3389/fmicb.2016.00176.

BAJAJ, P.; SINGH, N. S.; VIRDI, J. S. - *Escherichia coli* B-lactamases: What really matters. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 7:MAR (2016) 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00417.

BUSH, K.; JACOBY, G. A - Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 1098-6596. 54:3 (2010) 969–76. doi: 10.1128/AAC.01009-09.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. - A functional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 0066-4804. 39:6 (1995) 1211–1233. doi: 10.1128/AAC.39.6.1211.

CANTON, R.; COQUE, T. M. - The CTX-M B-lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**. . ISSN 13695274. 9:5 (2006) 466–475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.

CANTON, R.; GONZALEZ-ALBA, J. M.; GALON, J. C. - CTX-M enzymes: Origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 3:APR (2012). doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.

CDC -2015. [Consult. 9 jan. 2016]. Disponível em <http://www.cdc.gov/drugresistance/>.

CDDEP- **Antibiotic use** - 2010. [Consult. 16 abr. 2016]. Disponível em <http://resistancemap.cddep.org/resmap/use>.

COSTA, D.; POETA, P.; BRIÑAS, L.; SÁENZ, Y.; RODRIGUES, J.; TORRES, C.- Detection of CTX-M-I and TEM-52 B-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 1460-2091. 53:5 (2004) 960–960. doi: 10.1093/jac/dkh464.

COSTA, D.; POETA, P.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; ROJO-BEZARES, B.; JOUINI, A.; ZARAZAGA, M.; RODRIGUES, J.; TORRES, C.. - Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum B-lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal [4]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 58:6 (2006) 1311–1312. doi: 10.1093/jac/dkl415.

CULYBA, M. J.; MO, C. Y.; KOHLI, R. M. - Targets for combating the evolution of acquired antibiotic resistance. **Biochemistry**. . ISSN 1520-4995. 54:23 (2015) 3573–82. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00109.

D'ANDREA, M. M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M.. - CTX-M-type B-lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**. . ISSN 14384221. 303:6-7 (2013) 305–317. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008.

DAUTZENBERG, M. J. D.; HAVERKATE, M. R.; BONTEN, M. J. M.; BOOTSMA, M. C. J.- Epidemic potential of *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST258: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**. . ISSN 2044-6055. 6:3 (2016) e009971. doi: 10.1136/bmjopen-2015-009971.

ECDC - **Antimicrobial resistance surveillance in Europa** - 2015. [Consult. 21 maio. 2016]. Disponível em <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; OLIVEIRA, C.; PRUDÊNCIO, C. - Molecular characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in northern Portugal. **The Scientific World Journal**. . ISSN 1537744X. 2014:2014). doi: 10.1155/2014/782897.

FERNANDES, R.; PRUDÊNCIO, C. - Post-surgical wound infections involving *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to b-lactams in two Portuguese hospitals. **International Wound Journal**. . ISSN 17424801. 7:6 (2010) 508–514. doi: 10.1111/j.1742-481X.2010.00723.x.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. - Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to B-Lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 37:10 (1993) 2045–2053. doi: 10.1128/AAC.37.10.2045.Updated.

GHAFOURIAN, S.; SADEGHIFARD, N.; SOHEILI, S.; SEKAWI, Z. - Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. **Current Issues Molecular Biology**. . ISSN 07490690. 17:2013) 11–22. doi: 10.1007/978-1-4614-8875-0_1.

GONÇALVES, A.; TORRES, C.; SILVA, N.; CARNEIRO, C.; RADHOUANI, H.; COELHO, C.; ARAÚJO, C.; RODRIGUES, J.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; POETA, P.; IGREJAS, G. - Genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates of pigs from a Portuguese intensive swine farm. **Foodborne Pathogens and Disease**. . ISSN 1535-3141. 7:12 (2010) 1569–1573. doi: 10.1089/fpd.2010.0598.

HAYAKAWA, K.; GATTU, S.; MARCHAIM, D.; BHARGAVA, A.; PALLA, M.; ALSHABANI, K.; MAHESH, U. - Epidemiology and risk factors for isolation of *escherichia coli* producing CTX-M-type extended-spectrum-lactamase in a large U.S. Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 00664804. 57:8 (2013) 4010–4018. doi: 10.1128/AAC.02516-12.

LAHLAOU, H.; HAJ KHALIFA, A. BEN; MOUSSA, M. BEN - Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum B-lactamase (ESBL). **Medecine et Maladies Infectieuses**. . ISSN 17696690. 44:9 (2014) 400–404. doi: 10.1016/j.medmal.2014.03.010.

LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A.; MEVIUS, D.; PEIXE, L.; POIREL, L.; REGULA, G.; TORNEKE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C.; THRELFALL, J. - Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum B-lactamases or AmpC B-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**. . ISSN 1537-6591. 56:7 (2013) 1030–7. doi: 10.1093/cid/cis1043.

LIVERMORE, D. - B-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. 8:4 (1995) 557–584.

LIVERMORE, D. M.; CANTON, R.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P.; ROSSOLINI, G.; ARLET, G.; AYALA, J.; COQUE, T. M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; LUZZARO, F.; POIREL, L.; WOODFORD, N.- CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 59:2 (2007) 165–174. doi: 10.1093/jac/dkl483.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L.- Emergence of CTX-M B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal: Report of an *Escherichia coli* isolate harbouring *bla*CTX-M-14. **Clinical Microbiology and Infection**. . ISSN 1198743X. 10:8 (2004) 755–757. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00930.x.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; NOVAIS, A.; SOUSA, J. C.; BAQUERO, F.; PEIXE, L. - High diversity of extended-spectrum B-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 60:6 (2007) 1370–1374. doi: 10.1093/jac/dkm381.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L.- Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum B-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 62:2 (2008) 296–302. doi:

10.1093/jac/dkn179.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J. C.; SILVA, D.; RAMOS, M.; ROCHA, J.; FERREIRA, H.; PEIXE, L. - Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum-B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 63:3 (2009) 616–618. doi: 10.1093/jac/dkn510.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L.- Commensal *Enterobacteriaceae* as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamases, integrons, and sul genes in Portugal. **Frontiers in Microbiology**. . ISSN 1664302X. 4:APR (2013) 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2013.00080.

MENDONÇA, N.; LEITÃO, J.; MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; CANIÇA, M. - Spread of extended-spectrum B-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 00664804. 51:6 (2007) 1946–1955. doi: 10.1128/AAC.01412-06.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. - **Medical Microbiology**. 2nd edition. Hong kong: Mosby international, 1998. ISBN 0-7234-2781-X.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BERTRAND, X.; MADEC, J. Y. - *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. **Clinical Microbiology Reviews**. . ISSN 10986618. 27:3 (2014) 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. - Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**. . ISSN 0954-6820. 252:2 (2002) 91–106. doi: 10.1046/j.1365-2796.2002.01026.x.

OMS -2011. [Consult. 9 jan. 2016]. Disponível em http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2011/whd_20110407/en/.

PARK, S. Y.; KANG, C.; CHUNG, D.; PECK K. R.; LEE, N.; SONG, J.- Risk factors and molecular epidemiology of community-onset , multidrug resistance extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli* infections. **The Korean Journal of Internal Medicine**. 101-2501 (2016). doi: 10.3904/kjim.2015.113.

PATEL, M. P.; FRYSZCZYN, B. G.; PALZKILL, T. - Characterization of the global stabilizing substitution A77V and its role in the evolution of CTX-M B-Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. . ISSN 10986596. 59:11 (2015) 6741–6748. doi: 10.1128/AAC.00618-15.

PFALLER, M.; ROSENTHAL, K.; MURRAY, P. - **Medical Microbiology**. 8th edition: Elsevier Sander, 2013. ISBN 978-0-323-29956-5.

PINTO, L.; RADHOUANI, H.; COELHO, C.; COSTA, P.; SIMÕES, R.; BRANDÃO, R.; TORRES, C.; IGREJAS, G.; POETA, P.- Genetic detection of extended-spectrum B-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from serra da estrela natural reserve in Portugal. **Applied and Environmental Microbiology**. . ISSN 00992240. 76:12 (2010) 4118–4120. doi: 10.1128/AEM.02761-09.

POETA, P.; RADHOUANI, H.; IGREJAS, G.; GONÇALVES, A.; CARVALHO, C.; RODRIGUES, J.; VINUÉ, L.; SOMALO, S.; TORRES, C. - Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. **Applied and Environmental Microbiology**. . ISSN 00992240. 74:23 (2008) 7439–7441. doi: 10.1128/AEM.00949-08.

RICE, L. B. - Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to B-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. **Mayo Clinic Proceedings**. . ISSN 1942-5546. 87:2 (2012) 198–208. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.12.003.

ROGERS, B. A.; SIDJABAT, H. E.; PATERSON, D. L. - *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. . ISSN 03057453. 66:1 (2011) 1–14. doi: 10.1093/jac/dkq415.

SOUSA, J. C. - **Antibióticos Anti-bacterianos**. 1ª edição. Porto: Publicações farmácias portuguesas, 2001. ISBN 972-98579-6-2.

SOUSA, J. C. - **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. 2ª edição. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2005. ISBN 972-8830-49-1.

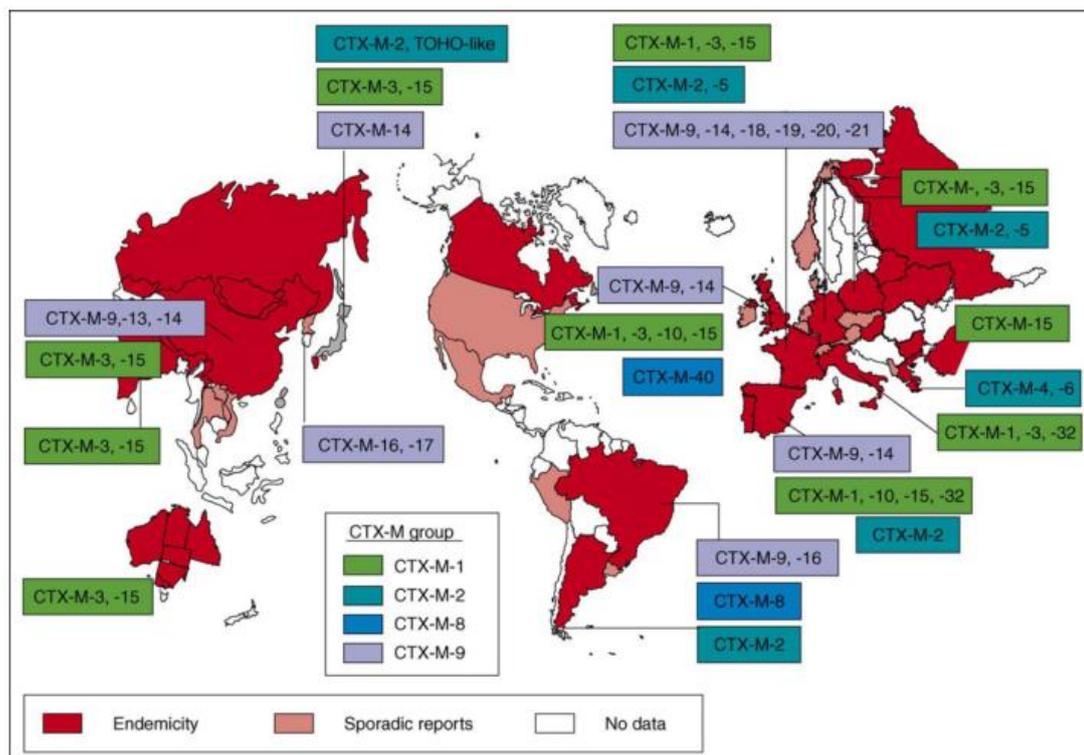
SRIDHAR, R. - **MICRORAO - CTX-M β -lactamases**, 2012. [Consult. 12 Maio 2016] Disponível em <http://www.microrao.com/micronotes/pg/ctx-m-beta-lactamases.pdf>

STEDT, J.; BONNEDAHL, J.; HERNANDEZ, J.; WALDENSTROM, J.; MCMAHON, B.; TOLF, C.; OLSEN, B.; DROBNI, M.- Carriage of CTX-M type extended spectrum B-lactamases (ESBLs) in gulls across Europe. **Acta Veterinaria Scandinavica**. . ISSN 1751-0147. 57:1 (2015) 74. doi: 10.1186/s13028-015-0166-3.

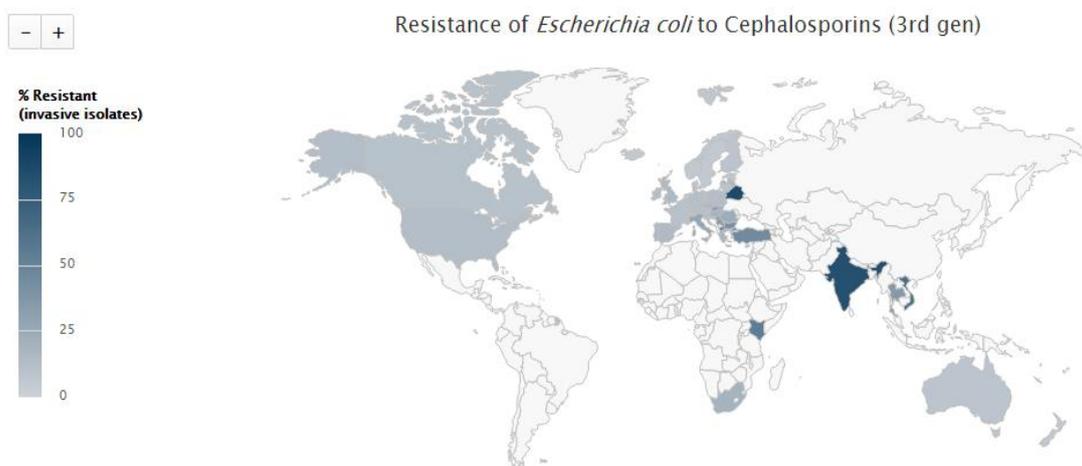
WOERTHER, P. L.; BURDET, C.; CHACHATY, E.; ANDREMONT, A.- Trends in human fecal carriage of extended-spectrum B-lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**. . ISSN 08938512. 26:4 (2013) 744–758. doi: 10.1128/CMR.00023-13.

ZAVASCKI, A. P.; BULITTA, J. B.; LANDERSDORFER, C. B. - Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Expert Reviews Anti-infective Therapy**. 11:12 (2013) 1–29.

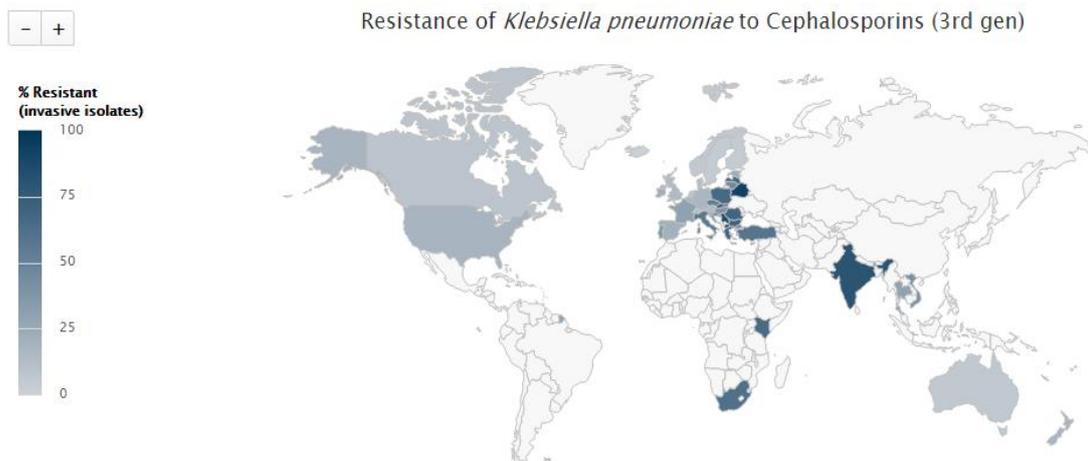
8. Anexos



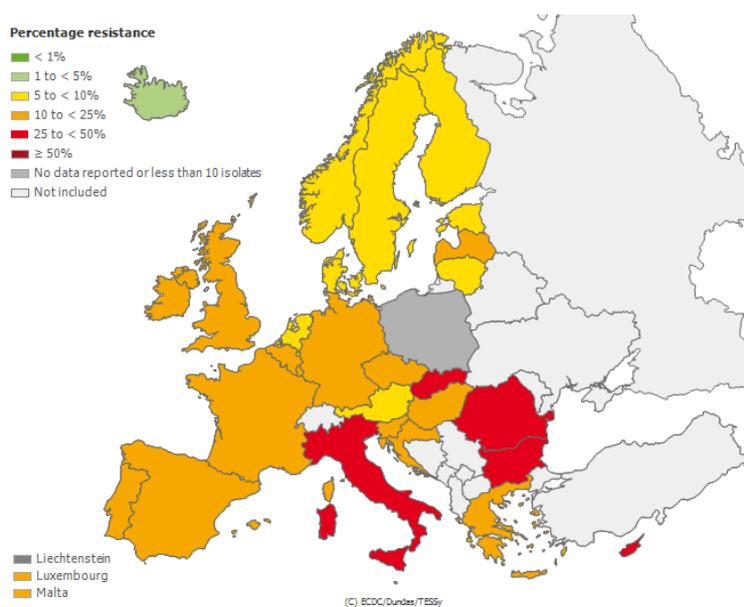
Anexo 1: Distribuição mundial das beta-lactamases CTX-M. (Adaptado de: (CANTON E COQUE, 2006)).



Anexo 2: Distribuição mundial da resistência de *E.coli* às cefalosporinas de 3ª geração. (Adaptado de: (CDDEP, 2010)).

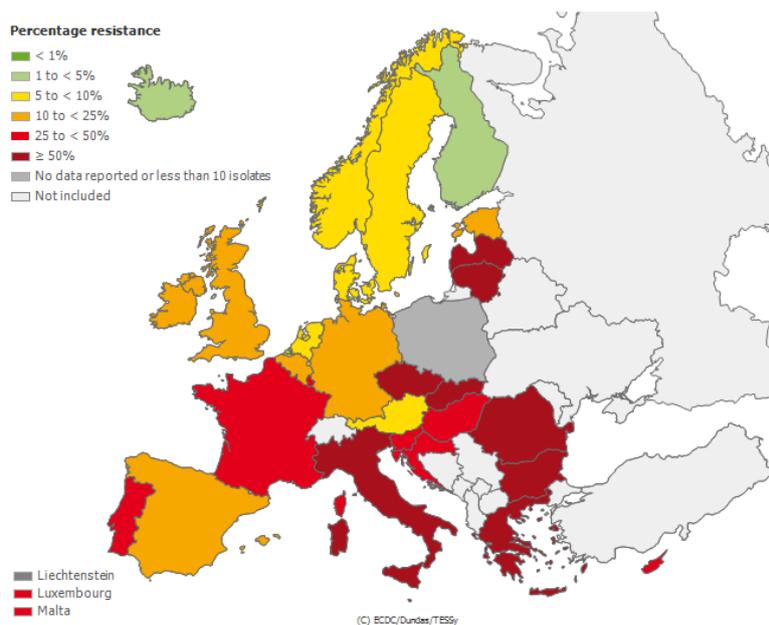


Anexo 3: Distribuição mundial da resistência de *K.pneumoniae* às cefalosporinas de 3ª geração (Adaptado de: (CDDEP, 2010)).



Anexo 4: Distribuição europeia da resistência de *E.coli* às cefalosporinas de 3ª geração em 2014. (Adaptado de: (ECDC, 2015)).

Epidemiologia das beta-lactamases CTX-M, em bactérias Gram negativo, em Portugal



Anexo 5: Distribuição europeia da resistência de *K.pneumoniae* às cefalosporinas de 3ª geração em 2014. (Adaptado de: (ECDC, 2015)).



Anexo 6: Casos reportados de *E.coli* ST131. (Adaptado de: (NICOLAS-CHANOINE et al., 2014)).

