

João Carlos Gonçalves Santos

Bactérias produtoras de KPC-papel na resistência aos β -lactâmicos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sara Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Carlos Gonçalves Santos

Bactérias produtoras de KPC-papel na resistência aos β -lactâmicos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Sara Domingues e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, João Carlos Gonçalves Santos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010127305, 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, 8 de Julho de 2015.

O aluno,

João Carlos Gonçalves Santos

A orientadora,

Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues

O estudante,

João Carlos Gonçalves Santos

Agradecimentos

O meu sincero agradecimento à minha tutora, a Professora Doutora Sara Domingues, pela disponibilidade, acompanhamento e incentivo que me concedeu na realização da presente monografia.

À minha família e amigos, por me proporcionarem o apoio, solidariedade e confiança durante o meu percurso académico.

“O mundo caminha rumo a uma era pós-antibiótico”

Keiji Fukuda

Índice

Abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	6
Introdução	7
1- Superbactérias	8
1.1- Contexto atual.....	8
1.2- Preocupações.....	8
2- Resistência bacteriana	9
2.1- Mecanismos de resistência.....	9
2.2- Mecanismos de transferência de genes.....	10
3- β-lactamases	12
3.1- Parede celular bacteriana.....	12
3.2- Caracterização.....	13
3.3- Classificação.....	14
3.4- Mecanismos de resistência.....	16
3.5- Carbapenemases.....	18
4- Enzima KPC	18
4.1- Origem e características.....	18
4.2- Gene <i>bla</i> _{KPC}	19
4.3- Métodos de deteção.....	20
4.4- Distribuição mundial de KPC.....	21
4.5- KPC em Portugal.....	24
4.6- Tratamento.....	26
Conclusão	28
Bibliografia	29

Abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARSIP - Programa de Vigilância de Resistência Bacteriana em Portugal

CDC - Centros de Controlo e Prevenção de Doença (Centers for Disease Control and Prevention)

CLSI - Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (Clinical and Laboratory Standards Institute)

CMI - Concentração mínima inibitória

CRE - *Enterobacteriaceae* carbapenemo resistente

ECDC - Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doença (European Centre for Disease Prevention and Control)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ICARE - Projeto de Vigilância Intensivo de Epidemiologia de Resistência Antimicrobiana

Inc - Grupo de incompatibilidade

INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MDR - Multirresistente (Multi-drug resistance)

NAG - Acetilglicosamina

NAMA - Ácido N-acetilmurâmico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBPs - Proteínas de ligação da penicilina (Penicillin binding proteins)

PCR - Reação de Polimerase em Cadeia (Polymerase Chain Reaction)

PDR - Pan-resistente (Pandrug resistance)

ST - Sequência tipo

TDC - Teste de Disco combinado

THM - Teste de Hodge modificado

XDR - Extensivamente resistente (Extensively-drug resistance)

Resumo

Os microrganismos têm evoluído de modo a sobreviver à ação bactericida ou bacteriostática causada pelos agentes antimicrobianos, adquirindo resistência. O uso abusivo de antibióticos foi um dos grandes fatores que impulsionou a perda de suscetibilidade das bactérias aos mesmos. As bactérias possuem a capacidade de transmitir genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, através da transferência horizontal de genes, o que aumenta a disseminação das resistências antimicrobianas.

A resistência de bactérias produtoras de carbapenemases aos antibióticos tornou-se uma das maiores preocupações de saúde mundial, no âmbito das infecções bacterianas. As *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), são β -lactamases pertencentes à classe A de Ambler, conferindo resistência aos antibióticos β -lactâmicos. A primeira carbapenemase KPC foi identificada em 1996, nos Estados Unidos. Atualmente, as bactérias produtoras de KPC estão disseminadas à escala global, existindo diversas zonas endêmicas e várias variantes da enzima detetadas, associadas a uma elevada morbidade e mortalidade.

Abstract

The microorganisms have evolved to survive the bactericidal or bacteriostatic action caused by antimicrobial agents, acquiring resistance. The overuse of antibiotics was one of the major factors driving the loss of susceptibility of bacteria to these compounds. Bacteria possess the ability of transmission of resistance genes between bacteria of the same or different species, through horizontal gene transfer mechanisms, with consequent increase of the antimicrobial resistance dissemination.

The carbapenemase-producing bacteria resistance to antibiotics has become a major global health concern, related with bacterial infections. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), β -lactamases of the Ambler class A, conferring resistance to β -lactamic antibiotics. The first KPC carbapenemase was identified in 1996, in the United States. Currently, they are spread on a global scale, existing several endemic areas and several variants of the enzyme detected, associated with a high morbidity and mortality.

Introdução

As infecções têm sido uma das principais causas de doença ao longo da história da humanidade. A descoberta acidental de um fungo produtor de penicilina, *Penicillium notatum*, pelo microbiologista Alexander Fleming, em 1928, ao trabalhar com culturas de *Staphylococcus aureus*, constituiu um passo gigante no campo da Microbiologia e permitiu o combate de várias infecções nos anos posteriores. Com a descoberta de vários mecanismos de combate às bactérias e a introdução de diversos grupos de antibióticos, as infecções bacterianas começaram a ser eficazmente combatidas e os níveis de mortalidade causados por estas diminuíram radicalmente [1].

Os antibióticos podem apresentar uma ação bacteriostática, impedindo o crescimento bacteriano, ou uma ação bactericida, levando à morte celular através da inibição de processos vitais para a célula bacteriana. Estes podem ser classificados por famílias consoante o seu mecanismo de ação: inibição da síntese da parede celular; inibição da síntese proteica nos ribossomas; inibição da síntese da membrana citoplasmática; alteração na síntese dos ácidos nucleicos; e alteração do metabolismo celular [1,6].

Apesar das vantagens do uso dos antibióticos no combate a doenças infecciosas, os microrganismos têm vindo a desenvolver mecanismos de resistência que causam um grande impacto no tratamento eficaz das mesmas.

No início do século vinte e um, o tratamento de doenças bacterianas está a tornar-se cada vez mais complicado devido à resistência das bactérias aos antibióticos. O uso abusivo destes fármacos, especialmente os de largo espectro durante as últimas décadas bem como a escolha de terapêuticas antibacterianas não específicas, por vezes através da experiência empírica, permitiram a evolução dos microrganismos, no sentido de desenvolvimento e aquisição de resistência aos antibióticos [2].

De acordo com o padrão de resistência adquirida, as bactérias podem ser classificadas em: multirresistente (MDR-“multidrug-resistant”), extensivamente resistente (XDR- “extensively drug-resistant”) e pan-resistente (PDR- “pandrug resistant”). Muitas definições têm sido dadas para MDR, XDR e PDR de forma a caracterizar as diferentes formas e tipos de resistência aos antimicrobianos, tendo estas sido harmonizadas por um grupo de peritos internacionais em três reuniões impulsionadas pelo Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doença (ECDC) pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doença (CDC) em 2008, 2009 e 2010 [3].

De acordo com as definições atuais, uma bactéria MDR não é suscetível, a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos; uma XDR caracteriza-se pela não suscetibilidade a, pelo menos, um agente em todas as famílias de antibióticos, mas suscetível a uma ou duas famílias; e uma bactéria PDR é definida como não suscetível a todos os agentes de todas as famílias de antimicrobianos [3].

I - Superbactérias

I.1 - Contexto atual

As superbactérias são estirpes bacterianas que apresentam características de multirresistência a vários tipos de antibióticos, podendo até ser resistentes a todas as famílias de antibióticos (PDR) e apresentam sérias consequências na morbidade e mortalidade dos doentes [4]. O desenvolvimento destas superbactérias pode estar associado a condições ambientais que possibilitam essa resistência, com mecanismos de resistência intrínsecos ou adquiridos, com ambientes hospitalares que propiciam um quadro de fatores desfavoráveis (doentes debilitados, pós-cirurgia, más condições de higienização, etc) e ainda com o uso de antibióticos noutros contextos, como na agricultura e pecuária [2,4].

I.2 - Preocupações

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência aos antibióticos é considerada uma ameaça global. Foram analisados dados de 114 países e verificou-se que a resistência bacteriana alastrou-se a todas as regiões do planeta.

A OMS alerta para a necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos, sendo que cada país deve tomar medidas com o objetivo da racionalização do seu uso e retardar os processos de disseminação da resistência das bactérias [2].

Um estudo britânico calculou as taxas de mortalidade provocadas pelas superbactérias, assim como o seu impacto económico nos sistemas de saúde. Atualmente, as infeções provocadas por superbactérias associadas a doenças como a tuberculose, infeções por *E. coli* e por *Klebsiella pneumoniae*, matam cerca de 700 mil pessoas por ano em todo o mundo. De acordo com as projeções deste estudo, as mortes anuais relacionadas com doenças provocadas por bactérias resistentes a antibióticos poderão ultrapassar, em 2050, os 10 milhões, com maior incidência na Ásia e em África [5].

É importante ter consciência desta ameaça global e desenvolver soluções. Segundo o relatório sobre a vigilância global da resistência bacteriana de 2014 da OMS, a multiresistência aos antibióticos já não é uma previsão para o futuro, já está a acontecer no presente. Sem ação urgente e coordenada, o mundo está a caminhar rumo a uma era “pós-antibiótico” em que ferimentos e infeções comuns tratáveis durante décadas, podem voltar a matar [2].

2- Resistência bacteriana

A resistência bacteriana é uma resposta inata ou desenvolvida pelas bactérias de modo a sobreviverem ao ataque de agentes antibacterianos e pode ser definida como a capacidade de resistir a concentrações clínicas de antibióticos [6].

Os mecanismos de resistência bacteriana podem ser intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca ocorre sem exposição primária ao agente antimicrobiano, sendo uma característica inerente ao microrganismo, comum a todas as estirpes da mesma espécie. Por exemplo, a ausência de parede celular em *Mycoplasma* spp. permite que estes sejam naturalmente resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos. A resistência adquirida é limitada a determinados isolados de uma espécie, podendo resultar da ocorrência de mutações ou da aquisição de genes através de mecanismos de transferência horizontal de genes [6,7].

2.1- Mecanismos de resistência

As bactérias podem ser resistentes aos antibióticos através de diferentes mecanismos:

- Inativação do agente antimicrobiano: produção de enzimas que inativam o antibiótico, por exemplo a hidrólise dos β -lactâmicos pelas β -lactamases e a acetilação dos aminoglicosídeos pelas acetilases (mecanismo de inativação enzimático) [7];

- Alteração da permeabilidade da membrana externa: diminuição da permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram negativo, ocorrendo diminuição da entrada das moléculas do agente antimicrobiano, perda de função das porinas (que facilitam a difusão de fármacos) ou ausência de porta de entrada (por exemplo: resistência aos carbapenemos por ausência de OprD-canal de aminoácidos básicos em *Pseudomonas aeruginosa*) [1];

- Alteração do alvo: caracteriza-se pela diminuição ou ausência de afinidade do agente antimicrobiano ao local de ligação, devido a alterações da estrutura do alvo (por exemplo: a metilação do ribossoma por metilases - macrólidos) [7];

- Bomba de efluxo: consiste em proteínas presentes na membrana que provocam um transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular (por exemplo: AcrB em *E.coli*) [1].

2.2- Mecanismos de transferência de genes

A transferência vertical de genes ocorre durante a reprodução assexuada, através de divisão binária, em que as células-filhas herdam o material genético da célula-mãe. Mutações, erros na síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) durante a replicação e falhas nos sistemas de reparação de ADN, são também herdados pela descendência [8].

A transferência horizontal de genes é um processo de troca de material genético entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes, podendo ocorrer por conjugação, transdução e transformação [9].

A conjugação resulta na transferência unidirecional do ADN de uma célula dadora para uma célula recetora, mediada por plasmídeos. Os plasmídeos são pequenos elementos genéticos que se replicam independentemente do cromossoma bacteriano. Na sua maioria são moléculas de ADN circulares, de cadeia dupla, que variam de 1.500 a 400.000 pares de bases, podendo codificar genes que trazem vantagens de sobrevivência à bactéria, tais como genes de resistência aos antibióticos e genes de fatores de virulência [8,9]. Alguns plasmídeos partilham o mesmo mecanismo de replicação e pertencem ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc), sendo incompatíveis entre si [8]. A conjugação requer um contacto íntimo entre duas células através de um pili sexual. A célula dadora, designada por F^+ , tem um plasmídeo F ou Fator F (de fertilidade) que permite a transmissão de material genético, enquanto a célula recetora, sem esse plasmídeo, se designa F^- (como está representado na figura 1). A conjugação possibilita a transferência de material genético entre espécies diferentes e é comum entre bacilos Gram negativo [8,9].

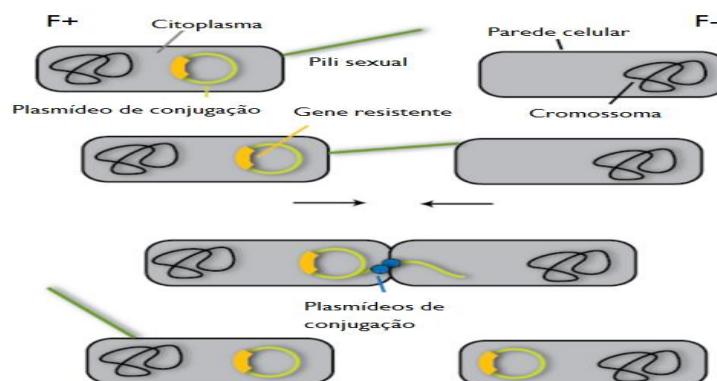


Figura 1: conjugação, mediada por plasmídeos entre uma célula dadora F^+ e um célula recetora F^- [32].

Na transdução, as moléculas de ADN são transferidas de uma bactéria para outra através de vírus, designados por bacteriófagos. Os bacteriófagos incorporam o ADN de uma bactéria hospedeira anterior no seu revestimento proteico externo. Ao infetar outra bactéria, o ADN bacteriano é transferido conjuntamente com o ADN do vírus (Figura 2). Se a bactéria sobreviver à infeção viral, pode passar a incluir os genes de outra bactéria no seu genoma, incluindo genes de resistência a antibióticos, o que pode alterar o seu perfil de suscetibilidade [8,9].

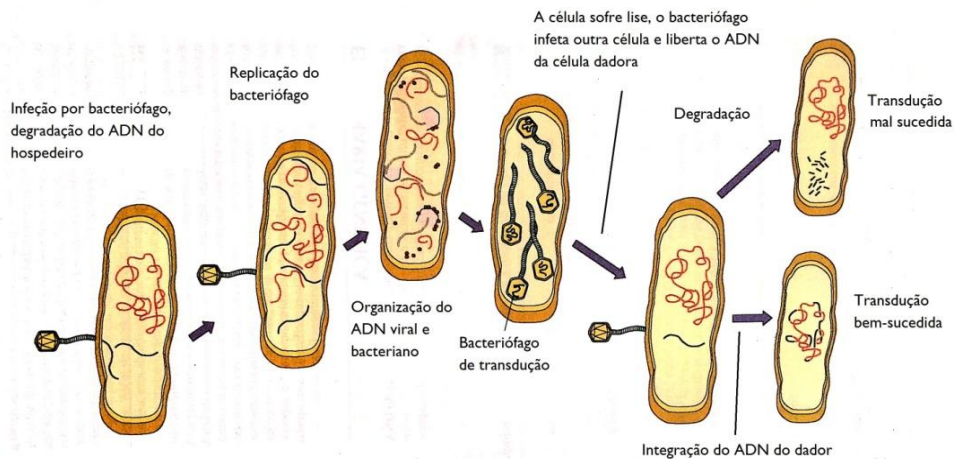


Figura 2: Representação esquemática do mecanismo de transdução, através de bacteriófagos [9].

Na transformação, a bactéria capta fragmentos de ADN dispersos no meio ambiente, sendo estes incorporados no seu genoma num processo que ocorre espontaneamente na natureza, por meio de recombinação homóloga. Esse ADN pode ser proveniente, por exemplo, de bactérias mortas. Para acontecer a transformação, as células têm que ser competentes de modo a serem capazes de captar o ADN para o interior da célula e inseri-lo no cromossoma hospedeiro. Este processo é aleatório e qualquer porção do genoma pode ser transferido entre bactérias [8].

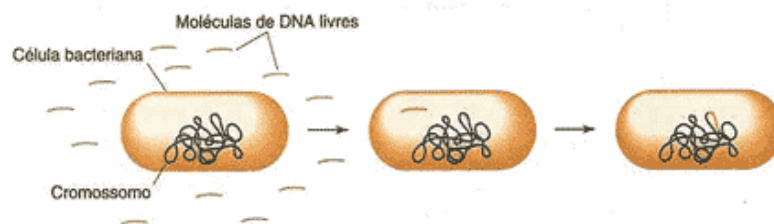


Figura 3: Representação do mecanismo de transferência de genes através da transformação [8].

3- β -lactamases

3.1- Parede celular bacteriana

As bactérias são microrganismos procarióticos (Figura 4), isto é, microrganismos unicelulares sem membrana nuclear, mitocôndrias, complexos de Golgi ou retículo endoplasmático, que se reproduzem por divisão assexuada [9]. A parede celular faz parte da constituição de grande parte das bactérias e exerce funções de rigidez e proteção, revestindo externamente a célula bacteriana, anexa à membrana citoplasmática. Um dos constituintes da parede celular é o peptidoglicano (constituente predominante em bactérias Gram positivo), que consiste numa rede rígida que é composta de cadeias lineares de polissacarídeos, unidas por ligações cruzadas. O polissacarídeo é constituído de dissacarídeos repetidos de N-acetilglicosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAMA) [1].

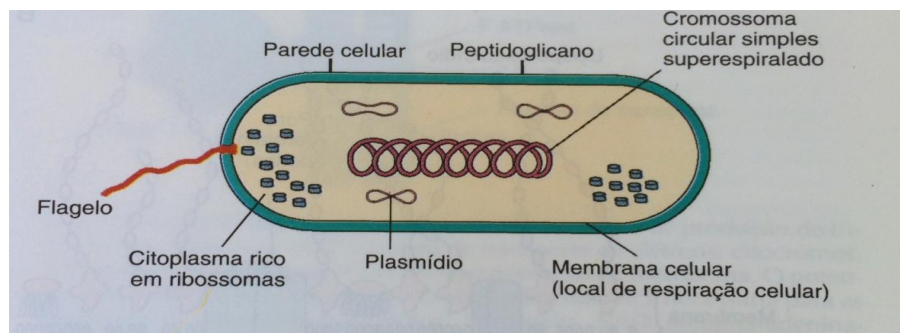


Figura 4: Estrutura de uma célula procariótica [9].

Resumidamente, a biossíntese do peptidoglicano passa por 3 etapas:

-1: Fase citoplasmática – síntese de pentapeptídeos de NAG e NAMA, constituintes do peptidoglicano em construção;

-2: Fase membranar – transporte desses pentapeptídeos através da membrana citoplasmática, alterando-os;

-3: Fase parietal – colocação dos pentapeptídeos na parede celular da bactéria em crescimento e promoção da ligação entre estes e a parede existente [1].

Os antibióticos β -lactâmicos inibem a biossíntese do peptidoglicano na sua fase terminal (parietal).

A biossíntese do peptidoglicano na fase parietal requer a quebra de ligações covalentes no peptidoglicano, por ação de autolisinas bacterianas (enzimas hidrolíticas do peptidoglicano

elaboradas pela própria bactéria), para permitir a inserção de novo peptidoglicano recém-sintetizado no citoplasma e transportado através da membrana citoplasmática bacteriana. Isto pressupõe a intervenção das enzimas D-D-carboxitranspeptidases, localizadas no folheto externo da membrana citoplasmática. Estas enzimas promovem o estabelecimento de pontes interpeptídicas (“cross-linking”) entre cadeias peptídicas vizinhas do peptidoglicano em crescimento e são também designadas por proteínas de ligação da penicilina (PBPs), uma vez que os antibióticos β -lactâmicos podem ligar-se a elas [1].

Os antibióticos β -lactâmicos inibem irreversivelmente as D-D-carboxitranspeptidases, impedindo o “cross-linking” (Figura 5) e induzindo a libertação de enzimas autolíticas que degradam a parede celular pré-formada, sendo essencial que o anel β -lactâmico do agente tenha intacta a ligação CO-N (Figura 6) [1].

A destruição do peptidoglicano, que é um componente essencial da parede celular bacteriana e que confere rigidez à célula e proteção às alterações osmóticas, leva à lise da bactéria [1].

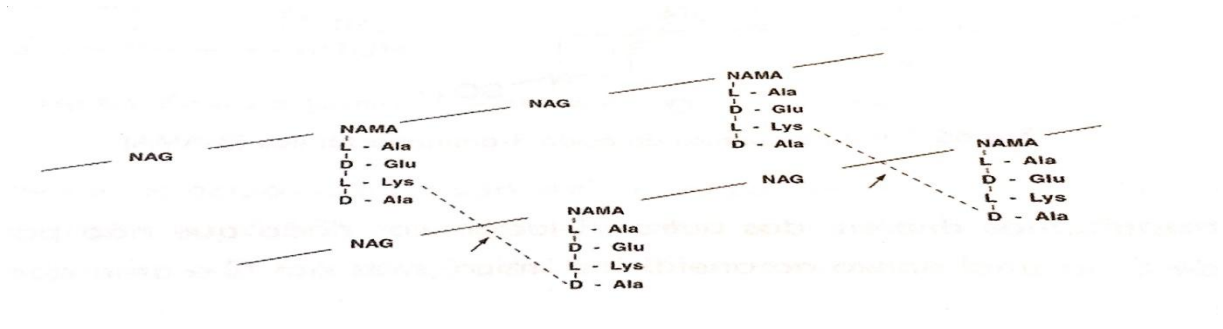


Figura 5: Local de inibição da biossíntese do peptidoglicano por β -lactâmicos [1].

3.2- Caracterização

As β -lactamases são enzimas que inativam os antibióticos β -lactâmicos (incluem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos), os quais possuem na sua estrutura um anel β -lactâmico constituído por três átomos de carbono e um de nitrogénio com radicais substituintes e formando uma ligação CO-N. O anel β -lactâmico pode aparecer fundido a estruturas cíclicas, como sucede nas penicilinas, nas cefalosporinas e nos carbapenemos, ou ligado a radicais não cíclicos, como acontece nos monobactamos. As β -lactamases catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico dos antibióticos β -lactâmicos, clivando o grupo amida. A resistência aos antibióticos β -lactâmicos depende do tipo de β -lactamase, da quantidade de enzima produzida, da localização celular da enzima, da afinidade da enzima

para o agente antimicrobiano, da capacidade da enzima em hidrolisar o anel β -lactâmico e da velocidade com que o agente β -lactâmico penetra na membrana externa (no caso das bactérias Gram negativo) [10].

As β -lactamases estão amplamente distribuídas, quer em bactérias Gram positivo quer em bactérias Gram negativo. As diferentes enzimas podem ser distinguidas com base nas suas propriedades catalíticas e moleculares, mas apenas a determinação da sequência de aminoácidos dá a informação sobre qual a filogenia molecular. As β -lactamases, cuja sequência de aminoácidos é conhecida, são divididas por grupos homólogos [10].

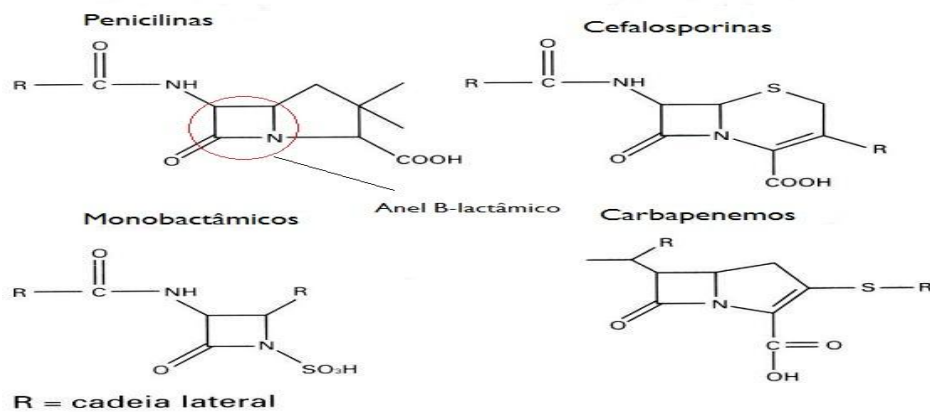


Figura 6: Sub-grupos dos antibióticos β -lactâmicos. Destaque para o anel β -lactâmico comum a todas as estruturas químicas [33].

3.3- Classificação

As classificações mais amplamente utilizadas para distinguir as diferentes β -lactamases são baseadas na sequência dos aminoácidos nas moléculas das β -lactamases, proposta por Ambler (1980), e na relação do perfil de substrato e dos inibidores com a sua estrutura molecular, proposta por K. Bush, Jacoby e Medeiros (1995), representadas na tabela I. Na classificação de Ambler, as β -lactamases estão organizadas em 4 classes moleculares (A, B, C e D). As enzimas pertencentes às classes A, C e D possuem um aminoácido serina no centro ativo da enzima [11]. Inicialmente as β -lactamases eram divididas em classe A - serino β -lactamases, com local ativo na serina e em classe B - metalo β -lactamases, caracterizadas por possuírem um ião de zinco no seu local ativo. Mais tarde, uma nova classe de serino β -lactamases foi descoberta, tendo pouco semelhança na sequência de aminoácidos em relação à classe A, sendo criada a classe C. Outra classe de serino β -lactamases com poucas semelhanças moleculares relativamente a classe A e C, conhecida como as oxacilinases (OXA β -lactamases), foi designada classe D. Na classificação de Bush, Jacoby e Medeiros, as

β -lactamases eram divididas por grupos (1, 2, 3, 4 e respectivas subdivisões), tendo esta sido atualizada em 2009, por Bush e Jacoby, incluindo 3 grupos e respectivas subdivisões [12]. Note-se que na presente monografia utilizarei a classificação proposta por Ambler.

A denominação das β -lactamases não segue nenhuma norma, sendo estas designadas de acordo com o nome do doente em que foram isoladas (exemplo:TEM, isolado de uma estirpe de *E. coli* da doente grega Temoniera); de acordo com o seu substrato (exemplo: OXA, atividade contra oxacilina); pelas suas propriedades bioquímicas (exemplo: CTX, com maior atividade contra cefotaxima) ou com o nome do hospital/cidade em que foi isolada (exemplo: MIR, Miriam Hospital ou NDM, New-Delhi β -lactamase) [1].

Grupo Bush-Jacoby	Classificação De Ambler	Perfil de Hidrólise (Substrato)	Inibido por:		Enzimas Representativas
			AC/TZB	EDTA	
I	C	Cefalosporinas	Não	Não	<i>E. coli</i> AmpC,P99,Act-I
Ie	C	Cefalosporinas	Não	Não	GCI, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sim	Não	PCI
2b	A	Penicilinas Cefalosporinas de primeira geração	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de largo espectro, Monobactamos	Sim	Não	TEM-3, SHV-2
2br	A	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de largo espectro, Monobactamos	Não	Não	TEM-50
2c	A	Carbencilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencilina, Cefepima	Sim	Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de largo Espectro	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemos	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de largo espectro	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenemos	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1) B (B3)	Carbapenemos	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CerA,IND-1 LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemos	Não	Sim	CphA, Sfh-1

Tabela 1: As duas classificações de β -Lactamases em vigor [12].

Legenda: AC-Ácido Clavulânico; TZB-Tazobactam; EDTA-Ácido etilenodiamino tetra-acético

3.3- Mecanismos de Resistência

As β -lactamases representam o principal mecanismo de resistência das bactérias aos antibióticos β -lactâmicos, através da inativação enzimática destes agentes. A hidrólise do anel β -lactâmico é feita pelas β -lactamases no espaço periplasmático, podendo utilizar dois mecanismos diferentes [10].

O primeiro mecanismo utiliza a via éster-serina (classes A, C e D), com o centro-catalítico de serina, dado que há ataque nucleofílico do grupo $-OH$ da serina ao C do anel β -lactâmico, dando origem a um intermediário acil-enzima (peniciloilenzima) e catalisa a desacilação muito eficazmente (Figura 7). No final a enzima é libertada, continuando ativa e disponível para hidrolisar outras moléculas de antibiótico. Admite-se que as serino- β -lactamases são semelhantes às PBPs, havendo alguma homologia de aminoácidos. As PBPs acilam os β -lactâmicos, mas diferem das β -lactamases dado que a desacilação ocorre lentamente ou não ocorre [1, 10].

No segundo mecanismo são utilizados iões de zinco no centro ativo em vez de serina (metalo- β -lactamases, pertencentes à classe B), diferindo das serino- β -lactamases porque não há a formação do intermediário peniciloilenzima, ocorrendo o ataque direto ao anel β -lactâmico (Figura 8) [1].

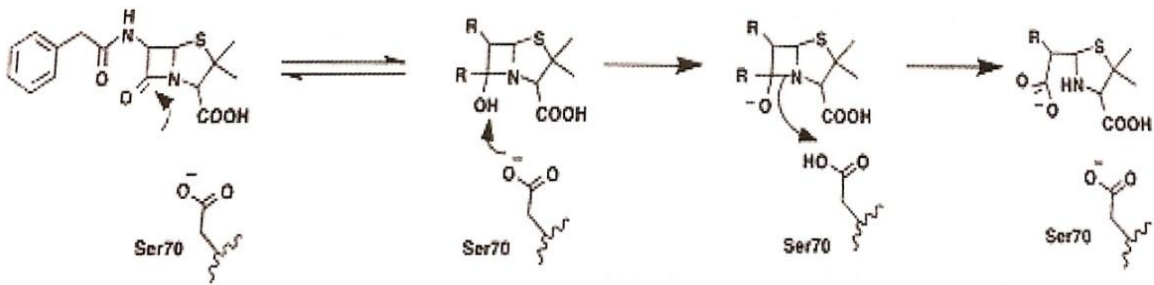


Figura 7: Mecanismo de inativação de antibióticos β -lactâmicos com β -lactamases com serina no centro ativo [1].

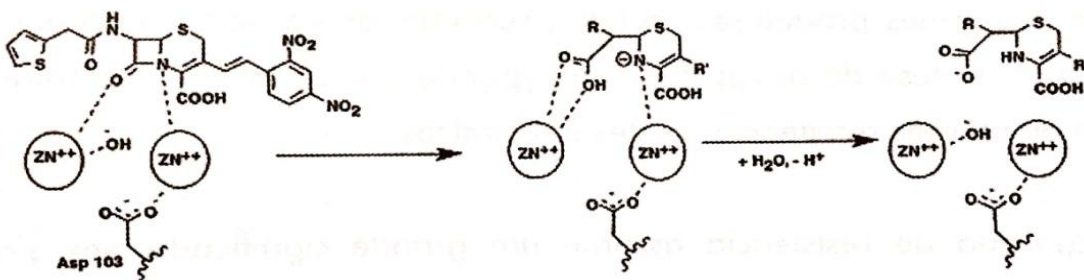


Figura 8: Mecanismo de hidrólise de um β -lactâmico por uma metallo- β -lactamase [1].

3.4- Carbapenemases

As carbapenemases são β -lactamases com capacidades hidrolíticas versáteis. Possuem a capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos. Os carbapenemos (exemplos: imipenemo, meropenemo e ertapenemo) diferem dos outros β -lactâmicos dado que não possuem um átomo de S no anel anexo ao β -lactâmico, mas sim uma ligação insaturada. Para além disso, enquanto os β -lactâmicos clássicos possuem aminoacil com configuração *cis* na cadeia lateral, os carbapenemos possuem hidroxietil e com configuração *trans* (Figura 6) [1].

Os carbapenemos são os antibióticos β -lactâmicos de maior espectro de atividade, dada a sua facilidade de difusão através dos canais de porina, que condicionam a permeabilidade da membrana externa, e elevada estabilidade à hidrólise por β -lactamases, como TEM-I, SHV-I, IRT. As bactérias produtoras de carbapenemases podem dificultar severamente o combate às infeções, nos quais devida a eficaz atividade dessas enzimas, os agentes beta-lactâmicos são inativados, incluindo os carbapenemos [1, 13].

As carbapenemases podem pertencer à classe A, B ou D de Ambler. As carbapenemases de classe A requerem uma serina na posição 70 do local ativo e incluem membros das famílias SME, IMI, NMC, GES e KPC. Destas, as carbapenemases KPC, são as mais prevalentes, sendo encontradas principalmente em plasmídeos em *K. pneumoniae*. As mais comuns da classe B são as IMP e VIM. As carbapenemases de classe D consistem nas do tipo OXA- β -lactamases e exibem um fraco poder hidrolítico sobre os carbapenemos, o que as distingue das outras carbapenemases, sendo frequentemente detetadas em *Acinetobacter baumannii* [13].

4- Enzima KPC

4.1- Origem e Características

As bactérias produtoras de *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) representam um grupo emergente de bactérias Gram negativo. Esta enzima é predominantemente encontrada em enterobactérias, causadores de infeções altamente resistentes a antimicrobianos e associadas a uma significativa taxa de mortalidade [14].

O primeiro membro da família KPC foi descoberto através do Projeto de Vigilância Intensivo de Epidemiologia de Resistência Antimicrobiana (ICARE) num isolado clínico de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte, Estados Unidos, em 1996 [15]. Este isolado era resistente a todos os β -lactâmicos testados, embora na presença do ácido clavulânico a concentração

mínima inibitória (CMI) para o imipenemo tenha diminuído. Tendo a primeira detecção da enzima ocorrido num isolado de *K. pneumoniae* e como a enzima de resistência era uma carbapenemase, essa β -lactamase foi designada de KPC-1 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). A descoberta da KPC-1 foi seguida de vários relatos de outras variantes da enzima por outras partes do mundo, tendo já sido detetadas pelo menos 11 variantes [14,15].

Curiosamente, uma recente correção na sequência genética de KPC-1 revelou que KPC-1 e KPC-2 são enzimas idênticas, e portanto a designação KPC-1 não deve ser mais usada. Através da análise de árvores de segmentação, a KPC-2 é provavelmente a enzima ancestral da qual derivam as outras variantes de KPC. As variantes de KPC identificadas só diferem de KPC-2 por alterações menores de nucleótidos em 4 codões diferentes (nucleótidos 147, 308, 716 e 814). Por exemplo, KPC-3 difere de KPC-2 por uma única base azotada de substituição (814C para 814T); KPC-6 difere de KPC-2 por uma substituição de base (716T a 716G). As variantes de KPC também diferem nas suas propriedades cinéticas e na sua capacidade de hidrolisar os diferentes β -lactâmicos [16].

Apesar de *K. pneumoniae* ser a espécie que apresenta KPCs com maior prevalência, a enzima já foi identificada noutras espécies bacterianas. Em 2009, o CDC propôs a mudança do termo KPC para *Enterobacteriaceae* carbapenemo resistente (CRE), pois estaria mais adequado, uma vez que existem várias espécies de bactérias Gram-negativo que podem possuir esta enzima. Contudo, o termo KPC continua a ser utilizado [17].

4.2- Gene *bla*_{KPC}

A família KPC é codificada pelo gene *bla*_{KPC}, cujo potencial para o aparecimento em diferentes espécies e disseminação geográfica é explicado em grande parte pela sua localização, na maioria dos casos, num transposição do tipo Tn3, Tn4401, com aproximadamente 10 kb, sendo bastante comum em estirpes da sequência tipo ST258. Este transposição é um elemento genético capaz de se inserir em diversos plasmídeos de bactérias Gram negativo [18,19].

O Tn4401 é delimitado por 2 sequências imperfeitas repetidas e invertidas, tendo no seu interior o gene *bla*_{KPC}, a Tn3 transposase, a Tn3 resolvase e duas sequências de inserção, *ISKpn6* e *ISKpn7*. Entre o *ISKpn7* e o *bla*_{KPC} pode existir uma deleção de 100 a 200 pares de bases, determinando as variantes do Tn4401. Em contraste, as estirpes pertencentes à sequência tipo ST11 e ST442, apesar de também abrigarem o gene *bla*_{KPC}, contêm elementos

genéticos que são distintos das estirpes com sequência tipo ST258, compartilhando apenas 2 kb da sequência do Tn4401 [18].

Estas descobertas sugerem que as estirpes ST258 são estirpes híbridas que surgiram a partir de uma estirpe ST11 ancestral que adquiriu um segmento cromossômico contíguo a partir de uma estirpe tipo ST442 por recombinação de ADN. A identificação dos elementos genéticos distintos que normalmente estão presentes nas estirpes portadoras de *bla*_{KPC} (ST258, ST11 e ST442), indica que o gene *bla*_{KPC} foi transferido para a estirpe ST258 por transferência horizontal de genes (e não por transmissão vertical a partir de ST11 ou ST442), após os eventos de recombinação [20].

A propagação de genes de resistência a antibióticos, como *bla*_{KPC}, é facilitada pelos mecanismos de transferência horizontal de genes entre bactérias, neste caso especialmente através de plasmídeos, aumentando a distribuição geográfica de genes de resistência aos antibióticos mais eficazes [18].

4.3- Métodos de detecção

A detecção de bactérias Gram negativo produtoras de carbapenemase é um desafio, uma vez que já foram descritas pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), KPCs com uma concentração mínima inibitória (CMI) baixa para os carbapenemos, dentro do intervalo de suscetibilidade, não existindo um método universal para a detecção de bactérias produtoras de carbapenemases [21].

Existem vários métodos fenotípicos de detecção de carbapenemases, tais como o Teste de Hodge modificado (THM), o Teste de Disco combinado (CDT) e E-Teste (E-Test) [21].

De acordo com as diretrizes do CLSI [22], a detecção de uma bactéria produtora de carbapenemases baseia-se num método de rastreio inicial para a resistência ao ertapenemo e ao meropenemo pelo método de difusão de disco ou da determinação da CMI, seguido do teste de Hodge modificado para confirmação (Figura 9). O THM apresenta elevada sensibilidade para detecção de carbapenemases, mas não é específico para KPC [21,22].

Para a realização do THM é feita uma diluição de 0.5 McFarland (1.5×10^8 células/ml) de *E. coli* ATCC 25922 (estirpe de referência), seguida de uma diluição 1:10 em Mueller- Hinton líquido. Esta é depois inoculada numa placa com Mueller-Hinton agar. No centro da área teste é colocado um disco de ertapenemo ou meropenemo (10 μ g) e os microrganismos a testar são semeados do bordo do disco para a periferia da placa, sendo incubados durante

16-24h, a $35\pm 2^\circ\text{C}$. Após este período, como se pode constatar na figura 9, um resultado positivo (1 e 3) para carbapenemase mostra crescimento de *E. coli* ATCC 25922, que em condições normais seria sensível ao ertapenemo, dentro do halo de inibição deste antibiótico. Um resultado negativo para a produção de carbapenemases (2) não apresenta crescimento de *E. coli* ATCC 25922 [32].

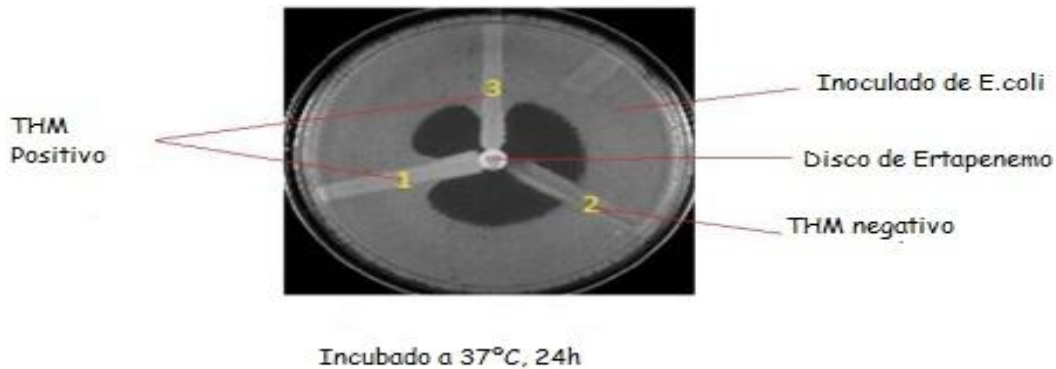


Figura 9: Teste de Hodge modificado [24].

A detecção do gene bla_{KPC} deverá ser feita através da reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando primers apropriados para a detecção de todas as variantes da enzima [23].

4.4- Distribuição mundial de KPC

A rápida disseminação global de KPC pode ser atribuída a uma combinação de três principais fatores sociais e microbiológicos: viagens internacionais, transmissão das bactérias de paciente para paciente e transferência de genes de resistência entre espécies [16].

Das variantes genéticas de KPC identificadas, a KPC-2 e KPC-3 são as mais comuns em casos clínicos e na maioria dos surtos epidêmicos. A KPC-2 é a mais predominante em todo mundo, com surtos decorrentes não só nos Estados Unidos, mas também na Europa, especialmente na Grécia, e na China. A KPC-3 tem sido detetada principalmente nos Estados Unidos, América do Sul e Israel [16]. Na tabela 2, estão representadas as variantes de KPC identificadas, o ano da identificação e a incidência geográfica.

bla_{KPC}	Ano de Identificação	Distribuição
KPC-1	1996	Estados Unidos
KPC-2	1998-1999	Estados Unidos, Israel, China, Taiwan, França, Grécia, Brasil, Itália, Colômbia
KPC-3	2000-2001	Estados Unidos, Israel
KPC-4	2003	Porto Rico, Escócia
KPC-5	2006	Porto Rico
KPC-6	2003	Porto Rico
KPC-7	2007-2008	Estados Unidos
KPC-8	2008	Porto Rico
KPC-9	2009	Israel
KPC-10	2009	Porto Rico
KPC-11	2010	Grécia

Tabela 2: Variantes de KPC listadas pelo ano de identificação e distribuição geográfica predominante [16].

América do Norte:

Como já foi referido, o primeiro isolado de uma bactéria produtora de KPC foi detetado nos Estados Unidos, em 1996. Até 2001, a deteção de KPC não era muito frequente, altura na qual começaram a ser documentados vários casos nos hospitais metropolitanos dos estados de Nova Iorque e Nova Jérquia. Os microrganismos produtores de KPC rapidamente se disseminaram pela costa Este e mais tarde pela costa Oeste dos Estados Unidos. No final de 2012 foram relatados casos de KPC em 38 dos 50 estados do país.

Porto Rico, apesar de ser uma ilha pequena, é considerada uma zona endémica devido aos imensos casos relatados de KPC, inclusive os primeiros isolados de KPC-4, KPC-5, KPC-6, KPC-8 e KPC-10 foram identificados no Porto Rico (Figura 10).

No Canadá, apesar de fazer fronteira com os Estados Unidos, apenas têm sido relatados casos esporádicos de KPC nos hospitais de Ottawa, Toronto e Montreal [16].

América do Sul:

A primeira identificação de KPC, na América do Sul, aconteceu na Colômbia, em 2006 (KPC-2). Posteriormente, os casos de KPC alastraram-se a várias partes do país (figura 10). Nos últimos anos, no Brasil e Argentina têm sido reportados casos de bactérias produtoras de KPC com alguma frequência [16].

Ásia:

No continente asiático tem havido vários casos de KPC, com particular incidência na China e Coreia do Sul, que apresentam uma grande variedade de microrganismos Gram negativo resistentes. Zhejiang, uma província chinesa, é considerada como o epicentro de bactérias produtoras de KPC (figura 10). Taiwan tem também bastantes casos reportados, tendo a maioria sido importados de Zhejiang [16].

Europa:

A primeira detecção de uma bactéria produtora de KPC, fora dos Estados Unidos ocorreu em Paris, França (KPC-2). Curiosamente, esse paciente tinha estado hospitalizado em Nova Iorque 2 meses antes, sugerindo a hipótese da importação do microrganismo resistente dos Estados Unidos.

Na Europa Ocidental, a prevalência de microrganismos com KPC é relativamente baixa, existindo, no entanto, algumas zonas europeias endêmicas e com surtos de KPC, com especial foco na Grécia (sobretudo em Atenas). A Itália e a França também apresentam historial de casos com KPC [16].

Médio Oriente:

O primeiro caso reportado de KPC, no Médio Oriente, foi em Israel, num viajante vindo de Nova Iorque em 2005. Israel foi assinalado como uma zona endémica de bactérias produtoras de KPC, levando à criação de um sistema governamental de comunicação e combate a bactérias produtoras de KPC [16].

Oceânia e África:

As bactérias produtoras de KPC não têm sido identificadas na Oceânia e no continente africano com grande frequência, existindo alguns casos esporádicos que normalmente resultam de viajantes que estiveram em zonas endêmicas [16].

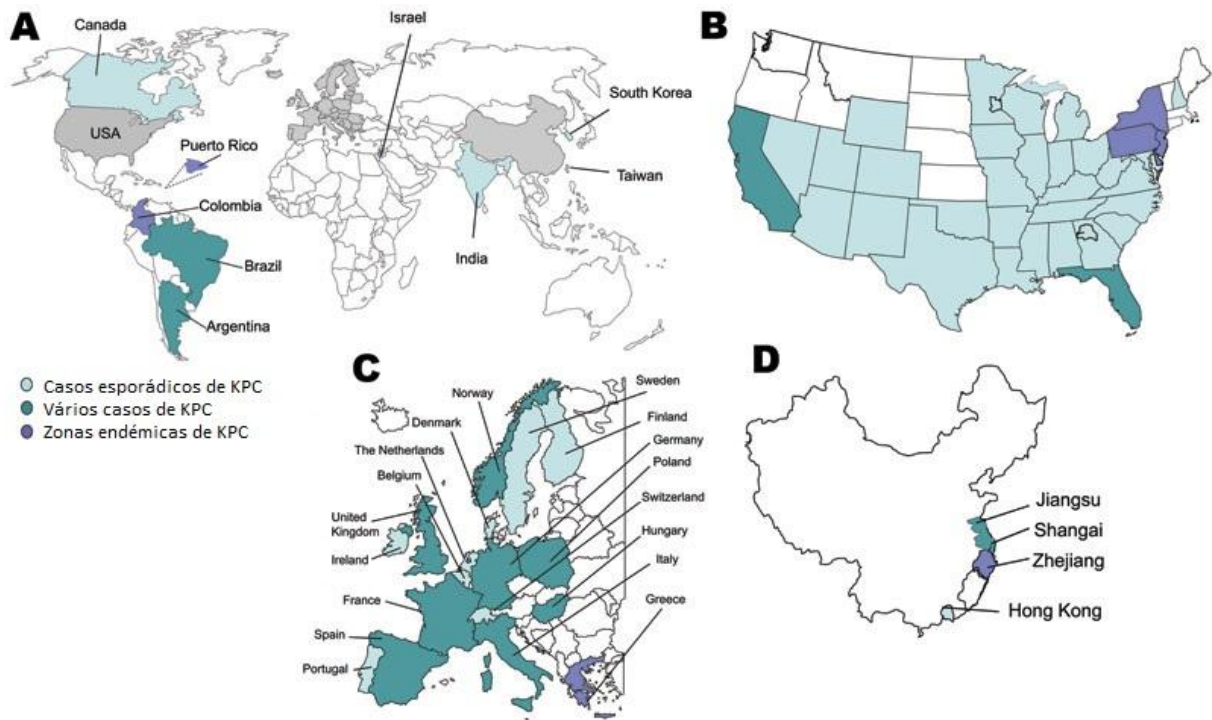


Figura 10: A-Distribuição mundial de KPC; B-Distribuição nos Estados Unidos; C-Distribuição na Europa; D-Distribuição na China [34].

4.5- KPC em Portugal

Apesar de Portugal ser, de uma forma geral, um país com elevada percentagem de resistências bacterianas [31], são poucos os casos em que se detetaram KPCs.

Caso I:

Em Dezembro de 2010, foram recolhidas 5 amostras de água de um rio em Santo Tirso com o objetivo de avaliar se o meio aquático em Portugal poderia ser reservatório de enterobactérias resistentes a carbapenemos. De todas as amostras apenas se verificou o crescimento de um tipo de colónia, perante seleção com 1 μ g/ml de imipenemo, correspondente a *E.coli*. Esta era resistente a todos os β -lactâmicos, incluindo a todos os carbapenemos.

Pesquisas moleculares para genes de carbapenemases utilizando PCR, detetaram o gene bla_{KPC2} . Na análise do conteúdo em plasmídeos no isolado de *E.coli* foi encontrado apenas um plasmídeo de 150 kb, que foi transferido com sucesso por conjugação para *E. coli* J53.

Em junho de 2011, foram recolhidas e analisadas outras amostras de água, no mesmo local, sob as mesmas condições, não tendo sido detetadas *E.coli* produtoras de carbapenemases.

Esta foi a primeira deteção de uma KPC em Portugal, com a particularidade do gene bla_{KPC2} ter sido identificado em *E.coli*, o que é raro, existindo apenas em alguns relatórios provenientes dos Estados Unidos, Israel, Brasil e França. Surpreendentemente, a amostra foi descoberta no meio ambiente, não tendo sido reportado nenhum caso humano na clínica até aquela altura [25].

Caso 2:

Num estudo, publicado no final de 2012, foram identificados 41 isolados multirresistentes, incluindo aos carbapenemos, isolados entre novembro de 2009 e junho de 2011. Entre estes isolados encontraram-se as seguintes espécies: *K. pneumoniae* (n=29), *Klebsiella oxytoca* (n=7), *Enterobacter aerogenes* (n=2), *E. coli* (n=2) e *Citrobacter freundii* (n=1), isolados a partir de diferentes produtos biológicos e examinados no Centro Hospitalar de Lisboa Norte. A maioria dos isolados (n=35, 85,4%) era proveniente de 31 doentes hospitalizados nos serviços de cirurgia, localizados em diferentes pisos, deste Centro Hospitalar.

Depois de realizados os estudos de suscetibilidade aos antibióticos, de acordo com as normas do CLSI e os testes de PCR, utilizando primers específicos para os genes bla_{KPC} , bla_{IMP} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{OXA} , verificou-se em todos os isolados a presença de bla_{KPC3} . A KPC-3 detetada apresentava capacidade hidrolítica para os seguintes antimicrobianos: imipenemo, meropenemo, aztreonamo, ceftazidima, cefotaxima, cefepima e cefoxitina. Não foram detetados os genes de outras carbapenemases incluídas na classe B, metalo- β -lactamases (bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{VIM}), ou na classe D (bla_{OXA}).

Neste estudo verificou-se a disseminação da carbapenemase KPC-3 por transmissão horizontal entre as diferentes espécies bacterianas *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. aerogenes* e *C. freundii*, associada ao plasmídeo conjugativo do grupo de incompatibilidade IncF. O gene bla_{KPC-3} foi encontrado maioritariamente em isolados de *K. pneumoniae* de sequência tipo ST14. Esta estirpe tem um elevado potencial de disseminação e de virulência, sendo frequentemente responsável por surtos hospitalares a nível mundial [26].

Caso 3:

Num estudo publicado em 2013, foram analisados 61 isolados de *Enterobacteriaceae* (26 *Klebsiella spp.*, 15 *E. coli*, 9 *Enterobacter spp.*, 6 *Morganella morganii*, 4 *Proteus mirabilis* e 1 *Serratia marcescens*), enviados ao Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) provenientes de vários hospitais portugueses, no âmbito do Programa de Vigilância de Resistência Bacteriana em Portugal (ARSIP), de vigilância

laboratorial da suscetibilidade aos antibióticos. A maioria das amostras foi isolada a partir da urina de doentes (≥ 65 anos) do sexo masculino, em 4 regiões distintas de Portugal.

Os isolados que apresentavam suscetibilidade diminuída ao imipinemo, meropenemo e/ou ertapenemo, e sinergia destes carbapenemos com o ácido borónico (e/ou ácido clavulânico), foram considerados putativos produtores de carbapenemases de classe A. A técnica de PCR foi utilizada para detetar e identificar os genes que codificam β -lactamases, assim como para o estudo do respetivo ambiente genético.

Dos 61 isolados estudados, 20 foram considerados putativos produtores de carbapenemases de classe A. No entanto, confirmou-se esta produção em apenas 6 isolados (5 *K. pneumoniae* e 1 *Enterobacter cloacae*), os quais apresentavam um fenótipo de multirresistência (resistência a pelo menos três classes de antibióticos estruturalmente não relacionadas).

A caracterização genotípica confirmou o fenótipo, pois identificou a sequência correspondente ao gene que codifica a carbapenemase KPC-3. A montante do gene *bla*_{KPC-3} foi identificado o transposão Tn4401 (variante d) com uma deleção de 68 nucleótidos, na zona do promotor; esta variante, até à data, foi apenas descrita nos Estados Unidos da América e no Canadá, associada a uma elevada resistência aos carbapenemos. Foram também identificados plasmídeos inseridos em diferentes grupos de incompatibilidade, dos quais apenas o IncFrepB foi transferido horizontalmente com o gene *bla*_{KPC-3}.

Em conclusão, o presente estudo sugere a disseminação do gene *bla*_{KPC-3} entre isolados com elevada diversidade genética, embora fosse encontrado localizado num elemento genético móvel idêntico, o Tn4401d, e este fosse veiculado por um único tipo de plasmídeo (IncFrepB) [27].

4.6- Tratamento

As infeções causadas por bactérias produtoras de KPC são predominantemente nosocomiais, afetando pacientes com múltiplos fatores de risco (idade avançada, estado severo de doença, tratamentos com antibióticos, transplante de órgão, ventilação mecânica, uso de cateteres intravenosos e longa estadia no hospital). Não existe um tratamento ideal para combater infeções provocadas por bactérias produtoras de KPC, estando as opções de tratamento limitadas [16,28,29].

As polimixinas são polipeptídeos cíclicos e catiónicos ligados a uma cadeia de ácidos gordos, constituídos por grupos de A-E. As poliximinas A e E (colistina), diferem apenas por

um aminoácido, atuam nas membranas externa e citoplasmática e apresentam bons resultados, *in vitro*, no combate de bactérias produtoras de KPC, com suscetibilidade de 90-100%. No entanto, o seu uso deve ser racionalizado, devido à nefrotoxicidade e neurotoxicidade associadas [16,29,30].

A tigeciclina é uma gliciliciclina que inibe a tradução proteica nas bactérias. É utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias produtores de KPC e outras bactérias Gram negativo MDR [28,30].

Os aminoglicosídeos (inibidores da síntese proteica), especialmente a gentamicina, são, por vezes, uma opção terapêutica, no entanto têm sido relatados casos de resistência. Algumas estirpes são sensíveis à gentamicina, sendo uma opção bastante viável no tratamento, enquanto outras estirpes podem modificar a gentamicina e outros aminoglicosídeos como, a amicacina e a tobramicina, diminuindo a sua eficácia no tratamento das infecções [28,30].

Os carbapenemos também podem ser utilizados em terapia combinada [30].

Apesar de não existir um tratamento padrão, através da análise estatística de vários casos clínicos documentados é possível afirmar que a terapia combinada (por exemplo: tigeciclina com colistina, tigeciclina com um carbapenemo, tigeciclina com colistina e um carbapenemo, tigeciclina com colistina e gentamicina, entre outras combinações) apresenta melhores resultados que a monoterapia (por exemplo: tigeciclina, colistina, gentamicina ou um carbapenemo) [28].

Já foram relatados casos de bactérias pan-resistentes, verificando-se resistência à tigeciclina, aminoglicosídeos e polimixinas, onde o prognóstico é bastante desfavorável [28].

Conclusão

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapia anti-infecciosa constituiu um enorme progresso da medicina. No entanto, a eficácia dos antibióticos foi rapidamente superada pela capacidade das bactérias em resistir aos mesmos. Este ganho de resistência face aos agentes antimicrobianos, deve-se à pressão de seleção exercida, principalmente, pelo uso intensivo de antibióticos de largo espectro contra as populações bacterianas. Como foi descrito na presente monografia, existem vários mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos. As bactérias possuem a capacidade de transmitir à descendência genes de carácter resistente, mas podem ainda transmiti-los às bactérias circundantes através de mecanismos de transferência horizontal de genes.

A família de carbapenemases KPC emergiu de forma rápida, estando distribuída um pouco por todo o mundo, inclusive já foram identificadas em Portugal. Como foi abordado na presente monografia, a disseminação de KPC é processada essencialmente por conjugação através de plasmídeos. As infeções provocadas por bactérias produtoras de KPC representam um grande desafio para os clínicos, devido às poucas opções terapêuticas. Os hospitais têm que estar preparados para identificar de forma rápida estes microrganismos e tomarem medidas de contenção e controlo da infeção. As bactérias produtoras de KPC podem ser consideradas superbactérias, dado à dificuldade do seu combate com antibióticos, sendo relatados alguns casos de microrganismos pan-resistentes.

No futuro é essencial que a escolha terapêutica dos antibióticos seja feita com base na etiologia da infeção e dentro de um espectro estreito de ação. Os governos mundiais deverão estabelecer medidas de prevenção e controlo das infeções causadas por microrganismos resistentes e fomentar o desenvolvimento tecnológico de novas classes antibacterianas. Durante a minha pesquisa, constatei que a comunidade científica mundial está em estado de alerta face à emergente ameaça de bactérias resistentes. A OMS tem tomado medidas de prevenção e controlo, como melhorias nas condições higiénicas em zonas de risco, melhorar o acesso a água potável, incremento de novas vacinas, informação das populações relativamente ao uso consciente dos antibióticos, fomento da inovação tecnológica, desenvolvimento de ferramentas e técnicas de diagnóstico e mudança de paradigmas na prescrição de agentes antimicrobianos.

Bibliografia

[1] SOUSA, João Carlos – Manual de Antibióticos Antibacterianos – Edições Universidade Pessoa (2005): p.18, 31-36, 107-122, 127-142.

[2] WHO – Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance (2014): p. 19-40.

Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf

[3] MAGIORAKOS, A. (et al) – Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 18 (2011): p.269-279.

Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x/pdf>

[4] KHAN, N.; SIDDIQUI, R. – War on terror cells: killing the host that harbours “superbugs” is an infection control strategy in our fight against infectious diseases. *Pathogens and Global Health*, Vol. 108 (2014): p. 4-10.

Disponível em: <http://www.maneyonline.com/doi/full/10.1179/2047773213Y.0000000125>

[5] O’NEILL, J. – Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The Review on Antimicrobial Resistance* (2014): p. 3-13.

Disponível em:

http://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf

[6] DAVIES, J. ;DAVIES, D. – Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 74 (2010): p. 419-423.

Disponível em: <http://mmbbr.asm.org/content/74/3/417.full.pdf+html>

[7] VAN HOEK, A. (et al) – Acquired antibiotics resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 2 (2011).

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202223/>

[8] PRESCOTT, Lansing; HARLEY, John; KLEIN, Donald – *Microbiology* – 4th Edition (1999), p.279-298, 315-318.

[9] MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken; KOBAYASHI, George; PFALLER, Michael – *Microbiologia Médica* – 3^a Edição (2000); Tradução: VOEUX, Patricia, p.1, 7, 13, 29-31, 137

[10] LIVERMORE, David – β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 8 (1995): p. 558-566.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172876/pdf/080557.pdf>

[11] BUSH, K.; JACOBY, G ; MEDEIROS, A. – A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 39 (1995): p. 1213-1217.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC162717/pdf/391211.pdf>

[12] BUSH, K.; JACOBY, G. – Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 54 (2009): p. 969-976.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825993/>

[13] QUEENAN, A.; BUSH K. – Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 20 (2007): p. 440-450.

Disponível em: <http://cmr.asm.org/content/20/3/440.long>

[14] ARNOLD, R. (et al) – Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria. *Southern Medical Journal*, Vol. 104 (2012): p. 40-45.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3075864/>

[15] CHEN, F. (et al) – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase: Extended spectrum β -lactamase continues to go global. *Medscape Infectious Diseases* (2009).

Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/587949>

[16] CHEN, F. (et al) – Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist*, Vol. 5 (2012): p. 133-141.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3460674/>

[17] DUIN D. (et al) – Carbapenem-resistant *enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 75 (2013): p. 115-120.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3947910/>

[18] NAAS T. (et al) – Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 52 (2008): p. 1257-1263.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292522/>

[19] MATHERS A. (et al) – Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio*, Vol. 2 (2011): p. 1-7.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202755/>

[20] CHEN, L. (et al) – Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. *mBIO*, Vol. 5 (2014): p. 1-6.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073492/>

[21] SOLANKI R. (et al) – Comparative evaluation of multiplex PCR and routine laboratory phenotypic methods for detection of carbapenemases among Gram negative bacilli. Journal of Clinical and Diagnostic Research, Vol. 8 (2014): p. 23-25.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4316255/>

[22] BENENSON, S. (et al) – Imipenem disc for detection of KPC carbapenemase-producing enterobacteriaceae in clinical practice. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 49 (2011): p.1617-1620.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122805/>

[23] DOERN, C. (et al) – Detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) production in non-*Klebsiella pneumoniae enterobacteriaceae* isolates by use of the phoenix, vitek 2 and disk diffusion methods. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 49 (2011): p. 1143-1147.

Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/49/3/1143.full.pdf+html>

[24] CDC – Modified Hodge Test for Carbapenemase Detection in *Enterobacteriaceae* (2010): p. 1-3.

Disponível em:

http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/HodgeTest_Carbapenemase_Enterobacteriaceae.pdf

[25] POIREL, L. (et al) – Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 56 (2011): p. 1662-1663.

Disponível em: <http://aac.asm.org/content/56/3/1662.full>

[26] CALISTO, F. (et al) – Carbapenemase KPC-3 em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* numa unidade hospitalar. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, Vol. 8 (2012): p. 127-133.

Disponível em: <http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2013/04/RPDI-VOL-8-N-3.pdf>

[27] MANAGEIRO, V. (et al) – Disseminação de isolados de Enterobacteriaceae produtores de carbapenemase KPC-3. Repositório Científico, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Vol. 3 (2013): p. 19-20.

Disponível em: <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2380>

[28] ZARKOTOU, O. (et al) – Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. Clinical Microbiology and Infection, Vol. 17 (2011): p. 1798-1803.

Disponível em:

[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61924-8/fulltext](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61924-8/fulltext)

[29] STEIN, C. (et al) – Three dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. Plos One, Vol. 10 (2015): p. 1-12.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465894/>

[30] DOI, Y. ; PATERSON, DL – Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Respiratory and Critical Care Medicine* (2015): p. 74-84.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25643272>

[31] ECDC – Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (2013): p. 3-66.

Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>

[32] Figura 1 – iGEM (2008).

Disponível em: http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Project/General_information

[33] WILLIAMS, J. - β -lactamases and β -lactamase inhibitors (1999).

[34] NORDMANN, P. (et al) – Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17 (2011): p. 1792.

Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3310682/>