



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Faria Mó

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Epidemiologia de Carbapenemases em Portugal numa Perspetiva de “One Health”” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Maria do Carmo Moço e da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Faria Mó

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Epidemiologia de Carbapenemases em Portugal numa Perspetiva de “One Health”” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Maria do Carmo Moço e da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2022

Agradecimentos

Aos meus pais, por sempre me apoiarem em todos os meus sonhos e nunca me deixarem desistir.

À Cristiana e ao César por me acompanharem desde sempre, me conhecerem como ninguém e nunca me abandonarem mesmo quando passava um mês sem os visitar.

À Carmen, por perceber o meu português à velocidade da luz e ter desempenhado o papel de segunda mãe como ninguém.

Ao Nery, por ser o irmão mais velho e mais novo que nunca tive e o melhor taxista do mundo.

À Daniela, por ter sido a melhor colega de casa, ser uma maravilhosa terapeuta e aturar as minhas crises existenciais.

À Beta, ao Medeiros e à Mary, por todos os momentos que passamos juntos que deram um brilho especial a Coimbra.

Às minhas meninas, Andreia, Luísa e Sansa, por me terem acompanhado desde o início desta jornada e proporcionado das melhores memórias que levo desta cidade.

À Dra. Maria do Carmo e toda a equipa da Farmácia Moço pela calorosa forma como me receberam e acolheram.

À Professora Doutora Gabriela Silva por toda a simpatia, disponibilidade e incansável apoio ao longo deste último ano.

À D. Sandra, ao Sérgio, à Sofia, à Diana, ao Tiago, à Anita, à Ana e ao Afonso, por todos os momentos passados no laboratório, sem vocês não tinha tido tanta piada.

A Coimbra, a minha segunda casa, que fez destes últimos cinco anos os melhores da minha vida.

A todos vós, o meu mais sincero Obrigada!

“Enquanto filósofa, acho que deves continuar a ocupar o tempo livre a encontrar paralelismos entre o céu e o sentido da vida”

João Cachada 

ÍNDICE:

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. Introdução.....	9
1.1. Farmacêutico.....	9
1.2. Farmácia Comunitária.....	9
1.3. Farmácia Moço	10
2. Estágio Curricular (EC).....	11
3. Análise SWOT	12
3.1. Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>)	12
3.1.1. Equipa.....	12
3.1.2. Meias de Compressão Elástica	12
3.1.3. Preparação Individualizada da Medicação (PIM) e Domicílios	13
3.1.4. Medicamentos Manipulados	14
3.1.5. Formação Contínua	15
3.1.6. Serviços Farmacêuticos	15
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	16
3.2.1. Regimes de Complementaridade.....	16
3.2.2. Lacunas na Formação Académica	16
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	16
3.3.1. Afluência / Localização da Farmácia.....	16
3.3.2. Iniciativas Promovidas pela Farmácia à Comunidade.....	17
3.3.3. Aposta na Fitoterapia	17
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>)	17
3.4.1. Medicamentos Esgotados/Rateados.....	17
3.4.2. Medicação Crónica	18
4. Casos Práticos.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

Parte II – Relatório de Estágio em Investigação no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra intitulado de “Avaliação da Atividade Antibacteriana de Drug-1 e Drug-2 em *Acinetobacter baumannii*”

LISTA DE ABREVIATURAS	23
PARTE A: ANÁLISE SWOT	24
1. Introdução.....	24
2. Análise SWOT	24
2.1. Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>)	25
2.1.1. Equipa.....	25
2.1.2. Formação Académica	25
2.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	25
2.2.1. Duração do Estágio.....	25
2.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	25
2.3.1. Participação em Projetos de Investigação	25
2.4. Ameaças (<i>Threats</i>)	26
2.4.1. Variáveis de Estudo Complexas.....	26

2.4.2. Disponibilidade de Material Condicionada	26
PARTE B: Atividade Antibacteriana de Drug-1 e Drug-2 em <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
1. Introdução.....	27
2. Metodologias.....	28
2.1. Materiais e Métodos.....	29
2.1.1. Estirpes e Meios de Cultura.....	29
2.2. Procedimento para realização de curvas de crescimento	29
2.3. Procedimento para contagem das unidades formadoras de colónias (UFCs)	30
3. RESULTADOS	31
3.1. Determinação de DO	31
3.2. Contagem de UFCs.....	34
3.3. Comparação dos dados obtidos.....	36
4. DISCUSSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
Anexos	40
Anexo 1 – Determinação da DO para Drug-1	40
Anexo 2 – Determinação da DO para Drug-2.....	41
Anexo 3 – Taxas de Crescimento para Drug-1	42
Anexo 4 – Taxas de Crescimento para Drug-2	43
Anexo 5 – Determinação de UFCs para Drug-1	44
Anexo 6 – Determinação de UFCs para Drug-2	45
Parte III - Epidemiologia de Carbapenemases em Portugal numa Perspetiva de “One Health””	
LISTA DE ABREVIATURAS	47
Resumo	48
Abstract.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
1.1. Bactérias e a sua parede celular	50
1.2. Antibióticos	51
2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS.....	52
2.1. Mecanismo de ação	52
2.1.1. Carbapenemos	53
3. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	54
3.1. Tipos de resistências.....	55
3.1.1. Mecanismos de resistência	55
4. CARBAPENEMASES	56
4.1. Classificação de Ambler	58
4.1.1. Carbapenemases classe A.....	58
4.1.2. Carbapenemases classe B	59
4.1.3. Carbapenemases classe D.....	61
5. EPIDEMIOLOGIA DE CARBAPENEMASES EM PORTUGAL	62
5.1. Monitorização e progressão da resistência a antibióticos.....	63
5.2. Monitorização e progressão do consumo de antibióticos	64
5.3. “One Health”	65
6. DISCUSSÃO.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



LISTA DE ABREVIATURAS

BPF – Boas Práticas Farmacêuticas

CIMPI – Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada

CPBESA – Centro Paroquial de Bem-Estar Social de Almalaguês

CRC – Centro de Reabilitação de Coimbra

DT – Diretora Técnica

EC – Estágio Curricular

FC – Farmácia Comunitária

FM – Farmácia Moço

MAPA – Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MM – Medicamentos Manipulados

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PA – Pressão Arterial

PIC – Preço Impresso na Cartonagem

PIM – Preparação Individualizada da Medicação

PVF – Preço de Venda à Farmácia

PVP – Preço de Venda ao Público

TF – Técnico de Farmácia

I. Introdução

I.1. Farmacêutico

Um farmacêutico, de acordo com as Boas Práticas Farmacêuticas (BPF) emitidas pela Ordem dos Farmacêuticos, é um profissional de saúde, mestre em Ciências Farmacêuticas, inscrito na Ordem dos Farmacêuticos, dotado de formação avançada na área do medicamento, desde a sua manipulação até aos seus efeitos, passando pela sua utilização por parte dos utentes (Ordem dos Farmacêuticos, 2009).

O papel do farmacêutico centrou-se inicialmente na preparação oficial de medicamentos ou substâncias medicamentosas, sendo que atualmente se foca nas necessidades do utente, ocorrendo assim a um alargamento dos serviços prestados na farmácia.

Esta evolução das atividades prestadas pelo farmacêutico fez com que o termo Farmácia de Oficina evoluísse para Farmácia Comunitária (FC).

Atualmente, o farmacêutico comunitário tem a seu cargo inúmeras funções de extrema relevância, desde a cedência de medicamentos até à análise do perfil farmacoterapêutico, mantendo o contacto com outros profissionais de saúde. A boa comunicação entre os vários profissionais de saúde permite um acompanhamento do utente mais célere e eficaz, detetar falhas e alterações na terapêutica, identificar utentes de risco.

Uma formação contínua na prática da profissão farmacêutico é de extrema importância. A participação em congressos, cursos, simpósios, entre outros, permite que o farmacêutico atualize os seus conhecimentos, atuando de forma mais segura e ciente e promovendo o uso responsável do medicamento, sendo, hoje em dia, uma prática comum entre a maioria dos farmacêuticos.

Em suma, a formação contínua do farmacêutico dota este de conhecimentos necessários para a satisfação das necessidades dos utentes, não apenas na sua vertente terapêutica, mas também na sua vertente preventiva (Ordem dos Farmacêuticos).

I.2. Farmácia Comunitária

A FC é tida como um espaço de prestação de cuidados de saúde que visa servir toda a comunidade com a melhor qualidade possível.

Os serviços de saúde prestados pelo farmacêutico são dirigidos tanto para o medicamento como para o utente, sendo desta forma necessário ter instalações adequadas para o efeito. As instalações devem encontrar-se devidamente equipadas, desde o fácil acesso à farmácia aos espaços interiores que permitam uma correta comunicação utente-farmacêutico.

As diversas áreas existentes nas instalações da farmácia assumem extrema importância atendendo aos serviços prestados nesta. Deve existir um gabinete para o Diretor(a) Técnico(a) (DT), de modo a permitir a sua confidencialidade, um gabinete de utente, de forma a permitir um atendimento mais personalizado, locais de receção de encomendas e um postigo e sistemas de segurança para proteção dos profissionais de saúde aquando da prestação de serviços em horário noturno.

Além disso, fazem parte das instalações laboratórios corretamente equipados com material para preparação de Medicamentos Manipulados (MM), locais de armazenamento para todos os produtos de saúde existentes na farmácia, sem esquecer o espaço de atendimento geral.

1.3. Farmácia Moço

A Farmácia Moço (FM) encontra-se localizada na Avenida Fernando Namora, número 252, situada numa zona habitacional, de fácil acesso, com paragem de autocarros à porta e parque de estacionamento amplo, o que também auxilia na boa visibilidade que detém. Consta de um horário de atendimento alargado, das 9h às 21:30h durante a semana e das 9h às 20h aos sábados. Este horário facilita a ida do utente à farmácia de acordo com o horário mais favorável.

Nos feriados encontra-se aberta das 9h às 19h e de 20 em 20 dias asseguram um turno de serviço permanente (aberto durante 24h), através de atendimento ao postigo após as 0h.

A equipa da FM é composta por nove elementos, cinco farmacêuticos, onde se insere a DT, a Dra. Maria do Carmo de Almeida Moço, três Técnicos de Farmácia (TF) e a senhora da limpeza, a D^a Júlia.

A farmácia é composta por dois andares, o rés-do-chão e a cave. No rés-do-chão encontra-se a sala de atendimento geral, dois gabinetes de atendimento personalizado, um gabinete executivo, um laboratório para preparação de MM e realização da Preparação Individualizada da Medicação (PIM).

Estes gabinetes de atendimento personalizado são utilizados para a realização de testes à COVID-19, consultas de nutrição Dieta EasySlim®, pela Dra. Sílvia Lopes e ainda de sessões de massagens terapêuticas com o Dr. Joaquim Paulo Fonseca, fisioterapeuta do Centro de Reabilitação de Coimbra (CRC).

Dispõe, ainda, de uma zona de *back-office* com prateleiras, um frigorífico para armazenamento de medicamentos de cadeia de frio e ainda um laboratório. Além da bancada

disponibilizada para a preparação de MM, encontra-se ainda no laboratório a máquina para a realização da PIM.

No andar de baixo, a cave, encontra-se integrada uma zona de receção de encomendas e devoluções, zona de arrumação de excessos de medicamentos e outros produtos que vão desde medicamentos de venda livre a produtos de higiene oral, capilares, suplementação, entre outros.

2. Estágio Curricular (EC)

O estágio curricular (EC) desenrolou-se em três fases, com ordem bem definida e aprimorada das tarefas desenvolvidas na farmácia de modo a preparar o melhor possível para o colmatar final, o atendimento ao público rápido e eficiente.

Inicialmente, passou por tarefas inerentes ao *back-office* como receção de encomendas, seu armazenamento e reposição de lineares. As encomendas podem ser realizadas aos armazéns de distribuição grossista ou ainda diretamente aos laboratórios. Na sua receção é importante começar pela separação dos produtos de frio, de modo a evitar a quebra da cadeia de frio. Além disso devem ser conferidos uma série de fatores que fazem com que seja bem-sucedida, como a verificação de prazos de validade, preço impresso na cartonagem (PIC), preço de venda ao público autorizado (PVP), preço de venda à farmácia (PVF), possíveis bónus, e estado das embalagens. No seu armazenamento, feito alfabeticamente, é relevante que este seja feito sob o conceito *first in, first out*, reduzindo possíveis problemas de prazos de validade. Nesta fase houve também um primeiro contacto com o laboratório para a preparação de MM.

Seguidamente, dá-se a fase de primeiras interações com receituário, ainda em regime *back-office*, para entregas ao domicílio e, conseqüentemente, com o sistema operado pela farmácia, o SIFARMA 2000®. Nestas interações com o receituário, permitiu tomar conhecimento dos vários regimes de comparticipação, assim como a conferência deste mesmo receituário para posterior comparticipação por parte dessas mesmas entidades.

Esta segunda fase potencia uma maior segurança e adaptação com todo o processo de atendimento, ainda que sem interação utente-farmacêutico, para a fase final, o atendimento.

Por fim, realizam-se tarefas de *front-office* com atendimento ao público, com um colega sempre disponível de modo a proporcionar um maior conforto, segurança e rápida ajuda nos primeiros atendimentos.

É de salientar que este processo de aprendizagem se torna bastante pragmático para o estagiário, dado que o facto de inicialmente se ocupar do armazenamento da medicação

proporciona um atendimento mais fluído e eficaz, pela já familiarização da localização dos produtos.

3. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta que permite fazer uma avaliação de diversos tipos de organismos, sejam empresas e/organizações, até ao desenvolvimento pessoal. Esta análise é realizada a dois níveis, interno e externo, identificando 4 vertentes. A nível interno avaliam-se os pontos fortes (*Strenghts*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) e a nível externo as oportunidades (*Opportunities*) e possíveis ameaças (*Threats*).

3.1. Pontos Fortes (*Strenghts*)

3.1.1. Equipa

A equipa da FM é bastante jovem e dinâmica, constituída por cinco farmacêuticos, a Dra. Maria do Carmo de Almeida Moço, o Dr. João Aveiro, a Dra. Inês Lucas, a Dra. Ana Fonseca e a Dra. Jéssica Lopes e três técnicos, o Dr. Daniel Silva, a Dra. Márcia Bastos e o Dr. Pedro Silva.

Toda a equipa nutre uma simpatia inegável tanto pelos utentes bem como disponibilidade e entreatuda com os colegas e mesmo estagiários. A prontidão na resolução de problemas e a procura por alternativas às adversidades é de ressalvar, o que leva a um melhor desempenho no coletivo e satisfação do utente.

3.1.2. Meias de Compressão Elástica

A FM dispõe de uma vasta linha de meias de compressão da marca *Sigvaris*[®] atendendo ao elevado nível de procura pelos utentes, sendo as mesmas prescritas para inúmeras indicações.

Como referido, estas meias de compressão apresentam diversos modelos, tanto para o sexo masculino, sexo feminino ou mesmo unissexo, atendendo ao tipo de tecido e grau de compressão.

A nível estético, estas podem ser de pé aberto como de pé fechado, na sua maioria cor da pele ou pretas.

De comprimento, estas podem ser até ao joelho (AD), até à raiz da coxa (AG) ou collants (AT) (*Medivaris*).

Quanto à indicação terapêutica, esta influencia o grau de compressão recomendado/prescrito podendo variar do grau 0 até ao 4 de acordo com os milímetros de mercúrio (mmHg):

- Compressão muito ligeira (CL0): 10 a 15 mmHg;
- Compressão ligeira (CL1): 15 a 21 mmHg;
- Compressão média (CL2): 22 a 32 mmHg;
- Compressão forte (CL3): 33 a 46 mmHg;
- Compressão muito forte (CL4): superior ou igual a 49 mmHg.

Independentemente da indicação do(a) médico(a) para o grau de compressão e modelo de meia, cabe ao farmacêutico fazer as medições de modo a determinar o tamanho correto para cada utente, sugerir o tipo de malha mais adequado para cada situação. Além disso explicar como calçar corretamente as meias, assim como todos os cuidados de modo a prolongar a vida útil da meia, como a lavagem diária.

3.1.3. Preparação Individualizada da Medicação (PIM) e Domicílios

A PIM consiste no processo de preparação individualizada da medicação para cada utente, de forma individualizada, para cada semana.

Em articulação com o Centro Paroquial de Bem-Estar Social de Almalaguês (CPBESA), todas as semanas é feita a preparação da medicação para os utentes do seu lar e alguns do centro de dia, de acordo com a terapêutica que lhes foi instituída. Esta iniciativa visa reduzir possíveis erros na toma da medicação, muitas vezes recorrentes da polimedicação.

Este processo está aprimorado graças a uma máquina especializada existente na farmácia adquirida para esse propósito. Possui todos os dados de cada utente, toda a medicação, incluindo os laboratórios que cada utente faz, o que auxilia a sua adesão à terapêutica pela familiaridade que mantêm com os comprimidos, bem como as posologias. Com estes dados, indica ao farmacêutico qual a medicação correta a inserir na máquina. Indica, também, a cada semana, por análise do número de comprimidos de cada caixa, a medicação que é necessária ser faturada para que não ocorram falhas na terapêutica.

Assim, o rigor da PIM mantém-se ao mais alto nível, com o processo automatizado e controlado por um farmacêutico, atento a alterações indicadas pelos médicos do lar, os quais facultam, regularmente, o receituário. Este procedimento obriga a um contacto permanente entre os vários intervenientes de saúde, médicos, farmacêuticos e enfermeiros.

Atualmente, a realização da PIM conta, principalmente, com os utentes do CPBESA. Além disso, a PIM também é realizada para utentes que, após visita à farmácia, mostraram dificuldades na adesão à terapêutica pela polimedicação imposta no regime terapêutico.

Quanto aos domicílios, alguns são feitos para o centro de dia de Almalaguês, mas encontram-se disponíveis a toda a comunidade, e muito requisitados por utentes mais debilitados ou com dificuldades de deslocação. Por chamada telefónica os utentes pedem todos os produtos de farmácia e posteriormente, ser-lhes-ão entregues nas suas moradias.

3.1.4. Medicamentos Manipulados

Os Medicamentos Manipulados (MM), de acordo com o Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., consistem em qualquer preparado oficial ou fórmula magistral preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico (INFARMEDa). Na maioria das vezes é uma preparação individual prescrita pelo médico segundo receita médica, nas suas diversas formas, descrevendo o doente a quem o medicamento se destina.

Cabe, então, ao farmacêutico a preparação e a dispensa do MM, devendo assegurar-se da garantia da qualidade do medicamento ao longo de todo o processo de preparação. De modo a assegurar o rigor em todos os passos, a farmácia dispõe de um Formulário Galénico Português, com elevado número de monografias e as respetivas fichas de preparação.

No final da preparação devem ser realizados ensaios não destrutivos e de avaliação das características organoléticas constantes da Farmacopeia Portuguesa, assegurando conformidade e qualidade para futura dispensa e utilização.

No ato da dispensa, o PVP é calculado de acordo com a Portaria n.º 769/2004, de 1 de junho que “Estabelece que o cálculo do preço de venda ao público dos Medicamentos Manipulados por parte das farmácias é efetuado com base no valor dos honorários da preparação, no valor das matérias-primas e no valor dos materiais de embalagem” (Portaria n.º 769/2004, de 1 de Julho).

Durante o período de estágio foram preparados vários MM. Qualquer dúvida relativa à preparação dos manipulados é sempre possível recorrer ao Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada (CIMPI) (LEF).

3.1.5. Formação Contínua

A constante aprendizagem permite que o farmacêutico se mantenha atualizado com todos os produtos de saúde presentes na farmácia, para seu melhor aconselhamento.

As formações são realizadas internamente e por entidades externas ou externamente à farmácia.

As formações internas são realizadas pelos colaboradores da farmácia de forma a expor a localização e características dos produtos existentes na farmácia.

As formações externas são ministradas por formadores dos diversos laboratórios, muitas das quais relacionadas com novos produtos introduzidos na farmácia, alterações em produtos já existentes, no sentido de abraçar novos desafios propostos pelos laboratórios.

Durante o estágio tive oportunidade de receber formação da *Cantabria Labs*[®] sobre produtos capilares e anti-celulíticos e formação da *Pure Encapsulations*[®] relativa a suplementos alimentares.

Com o aproximar do verão e, conseqüentemente, períodos de maior exposição solar, laboratórios como *MartiDerm*[®] e *ISDIN*[®] promoveram ações de formações alusivas aos seus solares.

Decorreu, ainda, no Hotel D. Inês uma ação de formação promovida pelo laboratório *Gedeon Richter*[®] referente à sua contraceção de emergência, *Postinor*[®], sob a forma de comprimido orodispersível.

3.1.6. Serviços Farmacêuticos

A FM possibilita à comunidade diversos tipos de serviços farmacêuticos, que vão desde a medição de parâmetros bioquímicos, perímetro abdominal, entre outros.

Recentemente a farmácia adicionou um novo serviço, que merece especial atenção dado o seu carácter diferenciador, a Monitorização Ambulatória da Pressão Arterial (MAPA).

Este serviço permite uma medição da Pressão Arterial (PA) durante 48h consecutivas, através da utilização de um equipamento que inclui um pequeno tensiómetro e uma braçadeira. O equipamento é colocado por um farmacêutico e este insere os dados do utente num sistema informático com capacidade de analisar, interpretar e armazenar todos os dados recolhidos.

A MAPA permite o diagnóstico de hipertensão arterial bem como a avaliação do risco de desenvolver eventos cardiovascular, uma vez que faz uma medição durante 48h. Este tempo de medição permite uma avaliação da PA durante o tempo de vigília e o sono, pois em algumas pessoas a PA não diminuí adequadamente durante as horas de sono, podendo implicar um

aumento do risco cardiovascular. Neste serviço a intercomunicação entre médicos e farmacêuticos é realizado com bastante rigor dado que, além da realização do relatório dos dados obtidos, estes são analisados por um cardiologista e posteriormente entregues pelo utente ao médico prescritor.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Regimes de Complementaridade

Os regimes de complementaridade, além da comparticipação do Estado, permitem ao utente usufruir de comparticipações suplementares, de acordo com os diversos regimes de comparticipação e portarias. Todos estes planos, independentemente do formato da receita, manual ou eletrónica, devem ser introduzidos no sistema através de um código específico para cada organismo. Este processo pode tornar-se moroso pelo número de regimes existentes tornando-se difícil de memorizar para o estagiário.

3.2.2. Lacunas na Formação Académica

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) aborda diversas temáticas, cobrindo as diversas áreas inerentes ao medicamento, contudo em cinco anos não é possível aprofundar as diversas temáticas, como por exemplo o aconselhamento de medicamentos oftálmicos, produtos de higiene oral e ainda alguns produtos de utilização em veterinária, o que cria algumas dificuldades na prestação da informação ao utente.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Afluência / Localização da Farmácia

A FM encontra-se bem localizada em uma avenida muito movimentada perto de uma zona residencial com um estacionamento amplo que possibilita um acesso fácil ao utente. Permite uma grande diversidade de utentes, com necessidades diferentes, levando a atendimentos diversificados, enriquecendo a aprendizagem.

A simpatia, dedicação e preocupação por parte da equipa para com o utente faz com que estes se sintam ouvidos e satisfeitos, acabando por se fidelizar à farmácia.

3.3.2. Iniciativas Promovidas pela Farmácia à Comunidade

Atualmente, a FM consta com serviços de testagem à COVID-19, consultas de nutrição *EasySlim*[®] e massagens terapêuticas, serviços muito procurados pela comunidade.

Pontualmente, a farmácia proporciona à comunidade dias de aconselhamento em dermocosmética com profissionais especializados. Nos dias comemorativos, são promovidas campanhas e ações aos utentes.

3.3.3. Aposta na Fitoterapia

Verifica-se uma maior procura e preocupação pelo utente em produtos naturais, pelo que a FM aposta em produtos de Fitoterapia de forma a dar resposta à procura do utente.

A FM é uma Farmácia Apoteca Natura[®] que dispõe de uma gama de produtos à base de plantas para os mais diversos sintomas apresentados pelo utente, permitindo a escolha deste de acordo com a sua preferência. Além destes produtos, também tem à sua disposição outras marcas de produtos à base de plantas, tais como *Aquilea*[®], *Pure Encapsulations*[®].

3.4. Ameaças (Threats)

3.4.1. Medicamentos Esgotados/Rateados

Certos medicamentos podem encontrar-se esporadicamente esgotados pelo laboratório face à grande procura ou outros problemas inerentes à sua produção ou dispensa por parte dos armazéns de distribuição grossista. Podem também existir numa quantidade escassa sendo considerados medicamentos rateados.

Por vezes estas condições não conseguem ser asseguradas, levando a que o utente se sinta obrigado a optar por alternativas, quando estas existem, ou então a alargar a sua procura noutras farmácias que, possivelmente, ainda terão *stock* da medicação em questão.

Na tentativa de melhor servir o utente, a farmácia tenta entrar sempre em contacto com outras farmácias indicando onde o utente poderá encontrar a medicação pretendida, não o deixando sem alternativa.

Medicamentos como o *Plenvu*[®], utilizado para preparação de um exame denominado de colonoscopia, esteve esgotado no mês de março (INFARMEDb). Como alternativa foi utilizado o *Moviprep*[®], utilizado para o mesmo efeito, que face à sua procura acrescida se encontrou posteriormente esgotado no mês de abril (INFARMEDc).

3.4.2. Medicação Crónica

Um dos grandes desafios vivenciados pelo farmacêutico passa pela compreensão do utente quanto à necessidade de apresentação de receita médica mesmo quando a terapêutica que fazem é considerada crónica.

Nestes casos tratam-se, muitas vezes, de utentes com mais idade e com maior dificuldade em reter informações bem como controlo das prescrições. Deste modo a farmácia poderia ter um papel mais ativo do que lhe é atualmente possível, permitindo a dispensa da medicação habitual ao utente, sem que este tenha de se dirigir aos centros de saúde e hospitais.

Outro grande desafio é a compreensão por parte dos utentes para os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) isentos de comparticipação pelo Estado, onde deve ser, na mesma, apresentada uma receita no ato da sua aquisição.

4. Casos Práticos

Caso Prático 1

Uma senhora entra na farmácia preocupada com o seu bebé de 3 anos que apresenta borbulhas brancas na zona das virilhas. Explica que tem aplicado uma pomada regeneradora com 40% de óxido de zinco da marca *ISDIN*[®] após a muda da fralda mas que não se tem mostrado eficaz (*ISDINa*).

Em conversa com a mãe sugeri deixar o bebé andar sem fralda nos períodos possíveis, dado que o calor, a fricção da fralda e a humidade poderão estar a influenciar o aparecimento das borbulhas, que poderão estar associadas a um processo inflamatório fúngico. Assim, aconselhei a aplicação de uma pomada da mesma marca com nitrato de miconazol durante sete dias, duas vezes ao dia (*ISDINb*). Após resolução da situação, manter a aplicação da pomada de zinco como ação preventiva. Caso não se verificasse uma evolução favorável, recomendei a ida ao médico.

Caso Prático 2

Um pai apresenta-se na farmácia à procura de aconselhamento para a sua filha que se encontra com diarreia. Menciona ainda que alguns dos seus colegas de turma também apresentam a mesma sintomatologia.

Aconselhei a toma de grandes quantidades de líquidos de modo a prevenir a desidratação, recorrendo a soluções de eletrólitos como o *Dioralyte*[®] podendo até colocar a preparação no frigorífico para facilitar a ingestão (*INFARMEDd*).

De modo a auxiliar a resolução da diarreia optei por recorrer à fitoterapia aconselhando *LenoDiar® Pediatric* que apresenta taninos e flavonoides na sua constituição, estando indicada para o tratamento de diarreia de diversas origens (Aboca).

Caso Prático 3

Uma senhora com cerca de 45 anos entra na farmácia à procura de ajuda dado que queimou os dedos enquanto cozinhava com óleo quente.

Referiu que colocou os dedos em água fria e uma pomada reparadora e cicatrizante que tinha em casa, mas que necessitava de algo mais específico e de rápida ação.

Para ajudar na cicatrização da pele recomendei a utilização de compressas impregnadas com ácido hialurónico pelas suas propriedades cicatrizantes através da retenção de água, hidratando a pele. Para uma maior eficácia, aconselhei aplicar uma camada de *Biafine®* por cima e cobrir com uma compressa e dedeira (INFARMEDe).

Caso Prático 4

Um senhor com cerca de 50 anos apresenta-se na farmácia referindo dificuldade em adormecer bem como em manter o sono há algumas semanas.

Alertei para a higiene do sono, tentando evitar luzes e ruídos pouco antes de se deitar, como televisão e telemóvel, bem como refeições pesadas à noite. Além disso recomendei a toma de *Aquilea Sono®* com 1,95mg de melatonina. Este suplemento tem dupla camada, uma com melatonina para ajudar a adormecer e outra com valeriana, passiflora e papoila da califórnia de modo a diminuir os despertares noturnos.

Caso Prático 5

Uma rapariga com cerca de 21 anos dirigiu-se à farmácia a pedir um antibiótico para uma infeção urinária, dando indicação que tem infeções recorrentes. Ouvi as queixas da utente, que realmente me pareceram compatíveis com a sintomatologia de uma infeção urinária. No entanto, expliquei que não poderia ceder um antibiótico sem receita médica e, apesar disso, não o devia de forma empírica.

Aconselhei a toma de *UriColi®*, suplemento direcionado para o desconforto urinário, estando especialmente direcionado para o caso de recidivas (LifeWell). É composto por arando, própolis e D-manose. Esta associação diminui a resistência aos antibióticos, cria uma barreira protetora das paredes da bexiga, aumentando a sua barreira fisiológica. Alertei também para todas as medidas não farmacológicas, além de aconselhar uma ida ao médico de modo a proceder a uma urocultura com eventual teste de suscetibilidade aos antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOCA - LenoDiar Pediatric [Consult. 5 mai. 2022]. Disponível em: [https:// www.lenodiar .pt/lenodiar-aboca/lenodiar-pediatric/](https://www.lenodiar.pt/lenodiar-aboca/lenodiar-pediatric/)

INFARMEDa - Medicamentos Manipulados [Consult. 1 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>

INFARMEDb - Resumo das Características do Medicamento - Plenvu [Consult. 4 mai. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

INFARMEDc - Resumo das Características do Medicamento - Moviprep [Consult. 4 mai. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

INFARMEDd - Resumo das Características do Medicamento - Dioralyte [Consult. 5 mai. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

INFARMEde - Resumo das Características do Medicamento - Biafine [Consult. 5 mai. 2022]. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>

ISDINa - Pomada de Óxido de Zinco [Consult. 5 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.isdin.com/pt-PT/produto/baby-naturals-nutraisdin/zn-40-pomada-regeneradora>

ISDINb - Pomada com Nitrato de Miconazol [Consult. 5 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.isdin.com/pt-PT/produto/baby-naturals-nutraisdin/AF-pomada-reparadora>

LEF - Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada [Consult. 4 jun. 2022]. Disponível em: https://www.lef.pt/pt/servicos/Paginas/Apoio_Farmacias.aspx

LIFEWELL - UriColi [Consult. 6 mai. 2022]. Disponível em: <https://lifewell.pt/uricoli/>

MEDIVARIS - Catálogo Flebiologia Sigvaris [Consult. 2 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.medivaris.pt/wp-content/uploads/2021/11/SIGVARIS.pdf>

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária, 2009.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Áreas Profissionais em Farmácia Comunitária [Consult. 1 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

Portaria n.º 769/2004, de 1 de Julho, Diário da República n.º 153/2004, Série I-B [Consult. 4 mai. 2022]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_769-2004.pdf/a0b1c512-ac77-42d4-9b06-8b1f3da9fb4d

Parte II

Relatório de Estágio em Investigação no Laboratório de Microbiologia

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**“Avaliação da Atividade Antibacteriana de Drug-1 e Drug-2 em
Acinetobacter baumannii”**



LISTA DE ABREVIATURAS

ATBs – Antibióticos

ATCC – American Type Culture Collection

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças

DMSO – Dimetilsulfóxido

DO – Densidade Ótica

EC – Estágio Curricular

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

H₂S – Sulfeto de Hidrogénio

LB – Luria-Bertani

MH – Mueller-Hinton

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OMS – Organização Mundial de Saúde

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

RSS – Espécies Reativas de Enxofre

UFCs – Unidades Formadoras de Colónias

PARTE A: ANÁLISE SWOT

I. Introdução

No último ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é realizado o estágio curricular. Além da sua realização em farmácia comunitária também é possível estagiar nas mais diversas áreas relacionadas com a área do medicamento. Deste modo, escolhi a vertente de Investigação na área da Microbiologia, sob a orientação da Prof. Dra. Gabriela Silva. Este estágio foi realizado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC).

O Estágio Curricular (EC) consistiu na determinação da atividade antimicrobiana de dois fármacos em desenvolvimento. Para esta determinação foram realizados testes de determinação da densidade ótica (DO) com realização de curvas de crescimento.

A avaliação da DO é utilizada como um método de determinação do crescimento bacteriano, através do rácio entre a luz incidente e a luz transmitida. Os valores obtidos são diretamente proporcionais ao crescimento bacteriano, ou seja, com o aumento do número de bactérias a densidade aumenta, logo a DO também aumenta. Através de determinações de DO ao longo do tempo é possível desenhar curvas de crescimento bacteriano representativas. A sua maior desvantagem é a não diferenciação entre bactérias vivas e mortas uma vez que ambos os tipos de células têm capacidade de absorção/bloqueio da luz.

A contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs) permite resultados mais fidedignos para o crescimento bacteriano pela avaliação quantitativa do número de células viáveis. Com a sua análise ao longo do tempo é possível analisar o comportamento das bactérias.

Estas duas técnicas combinadas são uma mais-valia porque a determinação da DO prevê uma determinação das diluições a serem posteriormente utilizadas para o a contagem das UFCs.

2. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta que permite fazer uma avaliação de diversos tipos de organismos, sejam empresas e/organizações, até ao desenvolvimento pessoal. Esta análise é realizada a dois níveis, interno e externo, identificando 4 vertentes. A nível interno avaliam-se os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) e a nível externo as oportunidades (*Opportunities*) e possíveis ameaças (*Threats*).

2.1. Pontos Fortes (Strengths)

2.1.1. Equipa

No laboratório de microbiologia da FFUC estão a ser desenvolvidos projetos de investigação tanto por professores investigadores como por alunos. Estes alunos frequentam diferentes cursos e ciclos de estudo.

Esta diversidade permite uma maior entreaajuda e partilha de ideias pela experiência que apresentam.

2.1.2. Formação Académica

Ao longo dos cinco anos do MICF há uma grande proximidade com o trabalho laboratorial, tendo presenciado aulas laboratoriais em diferentes unidades curriculares.

A presença nestas aulas permite uma maior familiarização com as metodologias de trabalho e segurança no laboratório, e correto manuseamento do material. A realização de protocolos laboratoriais rotineiros também possibilitou o contacto com as atividades realizadas diariamente nos laboratórios de investigação.

2.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

2.2.1. Duração do Estágio

Os projetos de investigação têm durações variáveis dependendo dos parâmetros em estudo e que se podem prolongar ao inicialmente esperado. Normalmente está relacionado com a formulação de novas questões decorrentes dos dados recolhidos, uma vez que a procura por informação é contínua.

De modo a obter resultados fidedignos e publicáveis, os resultados obtidos nos testes realizados devem ser replicáveis, o que implica a sua repetição.

Apesar de em três meses ser possível a realização de diferentes testes, não constitui tempo suficiente para a análise dos dados obtidos e obter conclusões adequadas.

2.3. Oportunidades (Opportunities)

2.3.1. Participação em Projetos de Investigação

O estágio inseriu-se no projeto de investigação de um aluno de doutoramento, o que permitiu uma maior proximidade com a área da investigação assim como o trabalho desenvolvido pelos investigadores.

Permitiu, ainda, o desenvolvimento de novas competências no âmbito da pesquisa de dados científicos e da análise crítica dos resultados, principalmente, com a sua interligação às hipóteses testadas.

2.4. Ameaças (*Threats*)

2.4.1. Variáveis de Estudo Complexas

No estudo de teorias e hipóteses delineadas pelos investigadores, muitas vezes obtém-se resultados que não eram esperados. Estes resultados necessitam de uma análise mais profunda, podendo advir de variáveis complexas inerentes aos compostos em estudo ou de interações que não foram previstas. Para a sua explicação são necessários testes adicionais, podendo alterar as premissas previamente definidas.

2.4.2. Disponibilidade de Material Condicionada

A realização do estágio compreendeu os meses de maio, junho e julho, coincidindo com o fim do período escolar académico.

Nestes meses, o abastecimento de material laboratorial, por parte dos fornecedores, tornou-se bastante demorado, não preconizando a dispensa de material necessária à realização das atividades laboratoriais.

Além disso, o facto de este material ser partilhado leva, nestas alturas de menor abastecimento, a uma maior coordenação e organização no seu racionamento e utilização.

PARTE B: Atividade Antibacteriana de Drug-1 e Drug-2 em *Acinetobacter baumannii*

I. Introdução

A espécie *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) caracteriza-se por ter forma de coccobacilos, ser Gram-negativo e não ter mobilidade. É ubíqua na natureza, sendo encontrada tanto em humanos como em animais e no ambiente (Carvalho, Silva e Teixeira, 2020).

Encontra-se principalmente associada a infecções nosocomiais, apresentando maior risco para doentes hospitalizados e imunodeprimidos, uma vez que penetra através da pele e das vias aéreas. A infecção hospitalar mais comum associada a este patógeno é a pneumonia, principalmente em pacientes que necessitam de ventilador (Ibrahim *et al.*, 2021). As infecções podem também decorrer ao nível do trato urinário, evoluir para estados de septicémia, e até por infecção e colonização em feridas na pele resultantes de acidentes ou lesões (Howard *et al.*, 2012).

O grande problema no tratamento das infecções por *A. baumannii* é a sua elevada resistência a antibióticos (ATBs), sendo assim considerada multirresistente. O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) reportou, em 2017, 8 500 casos de infecção por *A. baumannii* em doentes hospitalizados e 700 mortes, com um custo estimado, nos cuidados de saúde associados, de 281 milhões de dólares (CDC, 2019).

Esta bactéria multirresistente tornou-se uma grande preocupação para a comunidade científica, tendo sido classificada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como “Prioridade I: Crítico” numa lista divulgada em 2017. Esta lista identifica bactérias que precisam urgentemente de novos antibióticos criando a necessidade de novos métodos para tratar e gerir essas infecções (WHO, 2017). Na tentativa de descobrir novas vias de combate a infecções causadas por este patógeno, várias teorias têm sido formuladas.

Descobertas recentes sugerem que o sulfeto de hidrogénio (H_2S) pode ter um papel importante na resposta adaptativa durante infecções devido à sua capacidade de regular os canais iónicos, inibir a agregação plaquetária e promover vasodilatação, controlando a inflamação (Buret *et al.*, 2022). Este composto pode ser produzido por algumas bactérias como *Staphylococcus aureus*, que é um patógeno aeróbio. Nestas bactérias produtoras de H_2S , este composto contribui para a tolerância aos antibióticos pela redução da formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Shatalin *et al.*, 2011).

No caso das bactérias que não possuem enzimas de biogénese de H_2S , como *A. baumannii*, a sua eliminação pelos macrófagos infetados é feita mais facilmente. Também são menos

resistentes à morte mediada por leucócitos e eventualmente outras respostas imunes precoces (Ng *et al.*, 2020; Walsh *et al.*, 2020).

Foi reportado que o tratamento de *A. baumannii* com H₂S exógeno apresentou hipersensibilidade a diferentes antibióticos, independentemente do mecanismo de ação inerente. Além disso, este composto tem potencial para inibir citocromos respiratórios, diminuindo a síntese de ATP que, por sua vez, altera a homeostase da membrana (Ng *et al.*, 2020).

O potencial terapêutico do H₂S tem sido intensamente estudado para inúmeras patologias dada a sua ação em vários sistemas e órgãos por diferentes mecanismos (Powell, Dillon e Matson, 2018; Zhu, 2021). A sua capacidade regulatória de inflamação e inibição do stress oxidativo e apoptose tem-se mostrado vantajosa no tratamento de cardiomiopatias e de artrites (Smallwood *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2021).

O envolvimento do H₂S em vias de sinalização direcionadas e na supressão da atividade dos canais de K⁺ impedem o desenvolvimento de diferentes fibroses (Chirindoth e Cancarevic, 2021).

Além da sua aplicabilidade no tratamento de diferentes patologias, também pode reduzir alguns efeitos secundários provocados por alguns fármacos, como toxicidade gastrointestinal, pela modulação da microbiota intestinal (Motta *et al.*, 2015).

Com o desenvolvimento de fármacos para diferentes patologias com libertação de H₂S, colocou-se a hipótese que alguns poderiam ter atividade antibacteriana. Duas moléculas com esta capacidade foram cedidas por Antibe Therapeutics, On, Canada. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana de dois destes fármacos em estudo, a Drug-1 e a Drug-2, na tentativa de analisar a ação do H₂S na presença de *A. baumannii*, uma bactéria não produtora de H₂S.

2. Metodologias

Numa fase inicial os objetivos passaram pela determinação do potencial de atividade antibacteriana dos compostos através da determinação da densidade ótica (DO). A sua adição foi feita aos zero minutos, considerado tempo zero (T₀).

Posteriormente, pretendeu-se avaliar em que fase do crescimento bacteriano os fármacos são mais eficazes na sua atividade antibacteriana. Nesta fase, além da determinação da DO também se recorreu à contagem de unidades formadoras de colónias (UFCs).

2.1. Materiais e Métodos

2.1.1. Estirpes e Meios de Cultura

A estirpe de *A. baumannii* utilizada corresponde à estirpe padrão ATCC 19606 (American Type Culture Collection) isolada clinicamente. Os meios de cultura utilizados foram Luria-Bertani (LB) e Mueller-Hinton (MH).

Os fármacos foram preparados em soluções-mãe, na concentração de 10mM, com 10ml dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram armazenadas no congelador e ao abrigo da luz.

2.1. Procedimento para realização de curvas de crescimento

A determinação do potencial de atividade antibacteriana dos compostos foi realizada através da determinação de DO, recorrendo à utilização de um espectrofotómetro de feixe simples. Foram realizados dois testes distintos com a adição dos fármacos em períodos diferentes. Num primeiro teste, a sua adição foi feita aos zero minutos, considerado tempo zero (T0). Posteriormente, a determinação foi realizada com a adição aos cento e vinte minutos, considerado tempo quatro (T4).

Para esta determinação, foi inicialmente realizada uma cultura primária a partir da estirpe de *A. baumannii* ATCC 19606 e incubada durante a noite a 37°C. Desta cultura, foi inoculada 1 UFC em 5mL de meio a 37°C sob agitação orbital a 120rpm, durante a noite. (Fig.1)

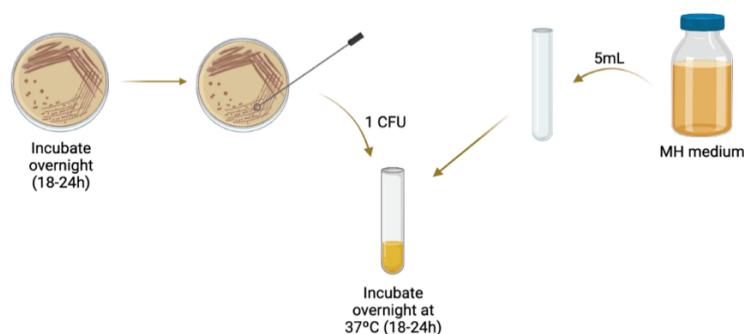


Figura 1 - Preparação de *Acinetobacter baumannii* ATCC19606.

No caso dos testes realizados com a adição do fármaco no T0, no dia da leitura de DO, a um dos frascos, considerado controlo, foi adicionado 1mL de DMSO para a determinação do valor de branco. O espectrofotómetro foi programado para fazer as leituras no comprimento de onda de 600nm e realizou-se a sua leitura, carregando no botão “zero”. Aos dois frascos de Erlenmeyer contendo meio líquido foi adicionado 1mL do meio contendo a bactéria foi adicionado e mediu-se a DO. (Fig.2)

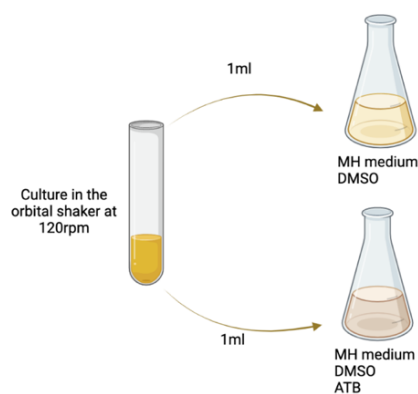


Figura 2 - Incorporação da bactéria no meio MH.

Posteriormente foi adicionado 1mL de solução-mãe ao segundo frasco, perfazendo a concentração final de 0,1mM, e realizou-se a uma nova medição de DO. Este valor foi subtraído pelo valor obtido antes da sua adição, permitindo obter o valor de DO correspondente ao fármaco. As medições de DO foram realizadas a cada 30min e aos valores correspondentes ao frasco contendo o fármaco, foi subtraído o valor de DO calculado anteriormente.

Para os testes com adição do fármaco no T4, a medição do valor de branco foi realizada retirando 1mL de meio líquido. Depois, a ambos os frascos foi adicionado 1mL do meio contendo a bactéria e a DO foi lida no mesmo intervalo de tempo. Aquando da medição correspondente aos 120min, ou seja, T4, realizou-se a medição da DO e, de seguida, a um dos frascos foi adicionado 1mL de DMSO e ao outro 1mL da solução-mãe de fármaco. A DO foi novamente lida. Os dois valores obtidos no T4 foram subtraídos, de forma a corresponder à DO do DMSO e do fármaco, respetivamente. Nas medições seguintes estes valores foram subtraídos de modo a ser obtido, apenas, o valor de DO correspondente às bactérias.

2.2. Procedimento para contagem das unidades formadoras de colónias (UFCs)

Para a contagem de UFCs, foram utilizadas placas de 96 poços contendo 900µL de solução de NaCl a 9%, previamente preparado. Ao longo de cada medição de DO, 100µL da amostra em estudo foram adicionados aos poços e foram efetuadas diluições sucessivas até à diluição de 10^{-7} . (Fig.3)

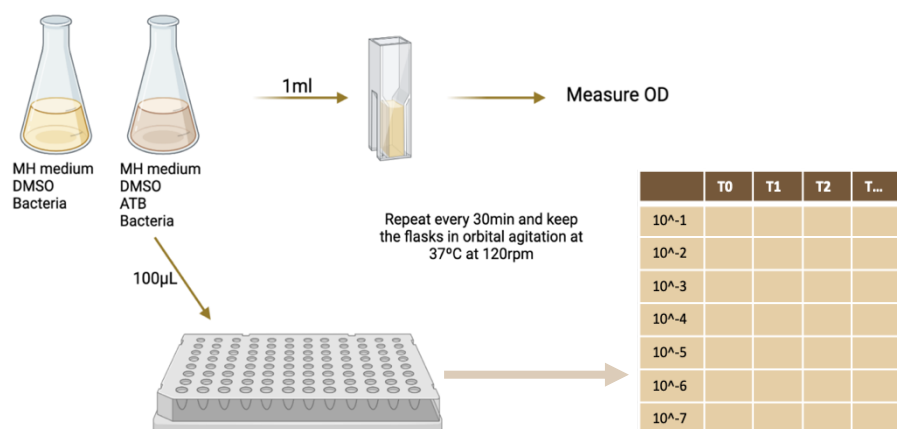


Figura 3 - Realização das Curvas de Crescimento.

Após a leitura dos valores de DO obtidos foram realizadas culturas com 100µL das diluições efetuadas, de acordo com a Tabela 1, que ao longo dos testes foi reajustada. Estas culturas foram incubadas a 37°C durante 18-24h. As placas devem conter colônias num total entre 30-300 CFUs.

Tabela 1 - Valores de diluição para curva de crescimento de *A. baumannii*

DO _{600nm}	Diluições
0 – 0,09	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵
0,09 – 0,2	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶
0,2 – 0,5	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷
> 0,5	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷

Este procedimento foi realizado em triplicado para ambos os compostos e nos dois momentos de adição dos fármacos.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação de DO

Para avaliar a atividade antibacteriana dos compostos, a determinação e interpretação das taxas de crescimento é essencial para a determinação desta taxa, foram selecionados os valores de DO que correspondem à fase exponencial do crescimento bacteriano. Os gráficos relativos aos valores médios obtidos encontram-se representados nas Figuras 4 e 5 e os gráficos representativos dos valores obtidos nos três testes nos Anexos 1 e 2.

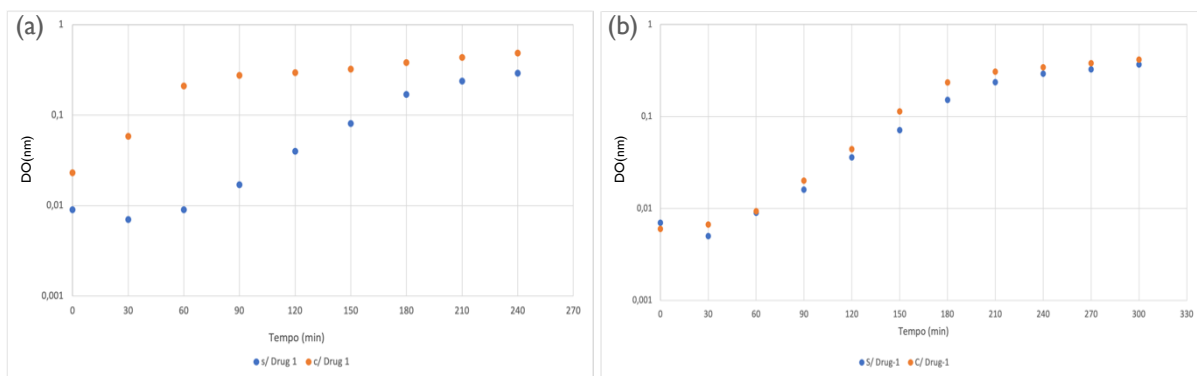


Figura 4 - Curva de Crescimento bacteriano com Drug-1 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

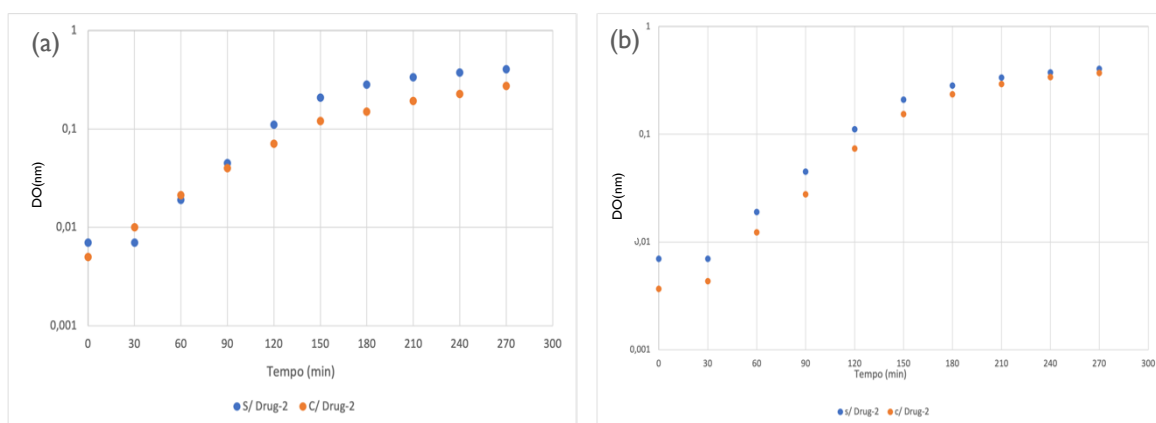


Figura 5 - Curva de Crescimento bacteriano com Drug-2 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

Analisando os gráficos do crescimento bacteriano e escolhendo os pontos correspondentes à fase exponencial, foi possível determinar a taxa de crescimento (Fig. 6 e 7).

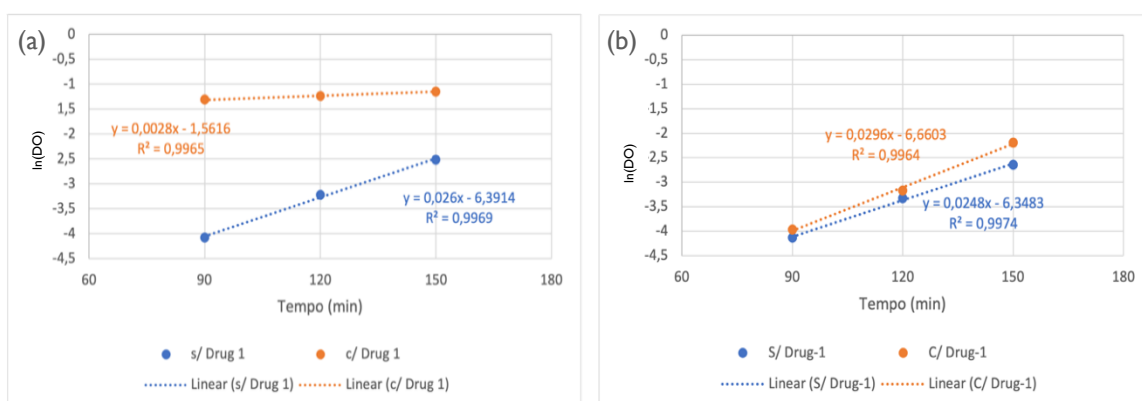


Figura 6 - Taxa de Crescimento com Drug-1 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

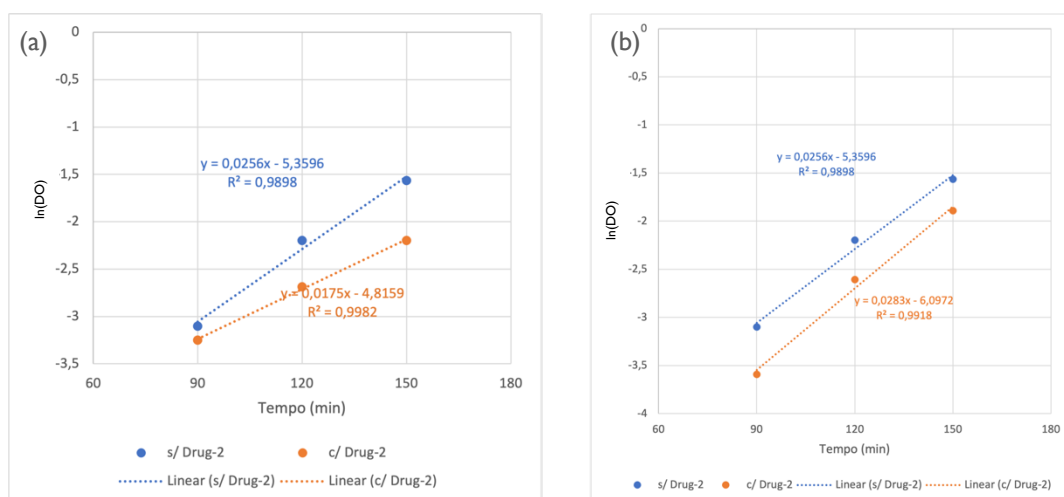


Figura 7 - Taxa de Crescimento com Drug-2 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

Estes valores encontram-se representados na Tabela 2 e os gráficos relativos às taxas de crescimento de todos os testes para os dois compostos encontram-se no Anexo 3 para o Drug-1 e no Anexo 4 para o Drug-2.

Tabela 2 - Taxas de Crescimento relativos aos testes de determinação de DO.

T(x)	Sem Drug-1	Drug-1	Sem Drug-2	Drug-2
T0	0,026%	0,0028%	0,0256%	0,0175%
T4	0,0248%	0,0296%	0,0256%	0,0283%

Para os testes com a adição de Drug-1 no T0 e no T4 obtiveram-se taxas de crescimento de 0,0028% e 0,0296%, respetivamente. Nos testes no T0 e T4 sem adição de Drug-1, 0,026% e 0,0248%, respetivamente. Estes valores mostram que no teste com adição de Drug-1 no T0 ocorreu uma redução na taxa de crescimento e no teste com a adição no T4 a taxa de crescimento foi ligeiramente superior para o teste com Drug-1, resultados concordantes com a curva de crescimento.

Nos testes com Drug-2, a taxa de crescimento para os testes realizados sem o fármaco foi de 0,0256%, para a sua adição no T0 de 0,0175% e para a adição no T4 de 0,0283%. Estes dados, assim como as curvas de crescimento, indicam redução do crescimento no teste com adição no T0.

Pode, ainda, ver-se uma diferença significativa no crescimento bacteriano nos testes com adição do Drug-1 e Drug-2 no início do teste quando comparados com os testes com a adição dos compostos a meio da exponencial. Estes dados mostram uma redução no crescimento bacteriano com a adição dos fármacos no início ao passo que se verificam taxas de crescimento

superiores para os testes com a adição dos fármacos quando se atinge o meio da exponencial quando comparados com os testes sem a sua adição.

3.2. Contagem de UFCs

Como os dados fornecidos pela DO representam todas as bactérias presentes na amostra, tanto viáveis como mortas, procedeu-se à contagem de UFCs para determinar apenas o número de células viáveis. Os gráficos relativos à determinação de UFCs de todos os testes para os dois compostos encontram-se no Anexo 5 para o Drug-1 e no Anexo 6 para o Drug-2.

Nos testes realizados com adição de Drug-1 no T0 e no T4, o crescimento bacteriano foi inicialmente semelhante, mas que se tornou superior para o frasco contendo o fármaco aquando do início da fase exponencial, ou seja, a partir dos 90min (Fig. 8). Na análise das taxas de crescimento pode observar-se na Figura 9 que este valor é superior no teste com adição de Drug-1 no início quando comparado com o sem a adição no mesmo período, 0,0632% e 0,0303%, respetivamente. No caso dos testes com adição de Drug-1 no T4, a taxa de crescimento foi superior aquando da ausência do fármaco, 0,0308% para 0,0293%.

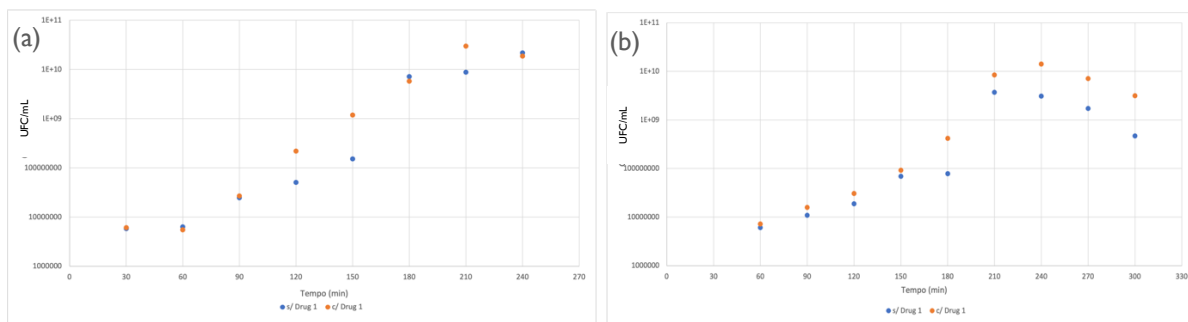


Figura 8 - Determinação de UFCs com Drug-1 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

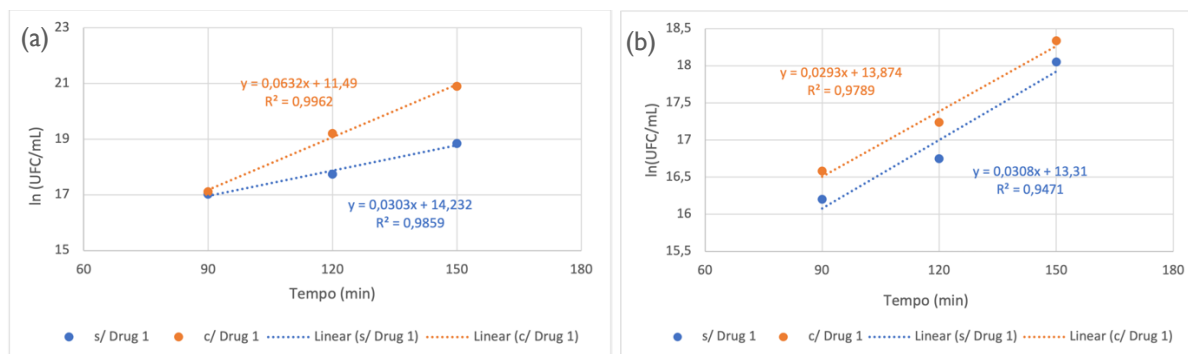


Figura 9 - Determinação da taxa de crescimento com Drug-1 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

Para o teste com adição de Drug-2 no T0, à exceção do ponto correspondente aos 270min, a curva com adição de Drug-2 apresentou valores de DO comparativamente inferiores aos testes sem a sua adição (Fig. 10). No entanto e analisando as taxas de crescimento, representadas na Tabela 3 e Figura 11, estas foram idênticas, tendo sido obtida uma taxa de 0,022% para o teste sem a adição de Drug-2 e 0,0242% para o teste com adição de Drug-2. Nos testes para o mesmo fármaco, mas com a adição no T4, a taxa de crescimento aumenta substancialmente quando comparada com os valores para o mesmo teste, mas sem a adição de Drug-2, 0,0418% e 0,022%, respetivamente.

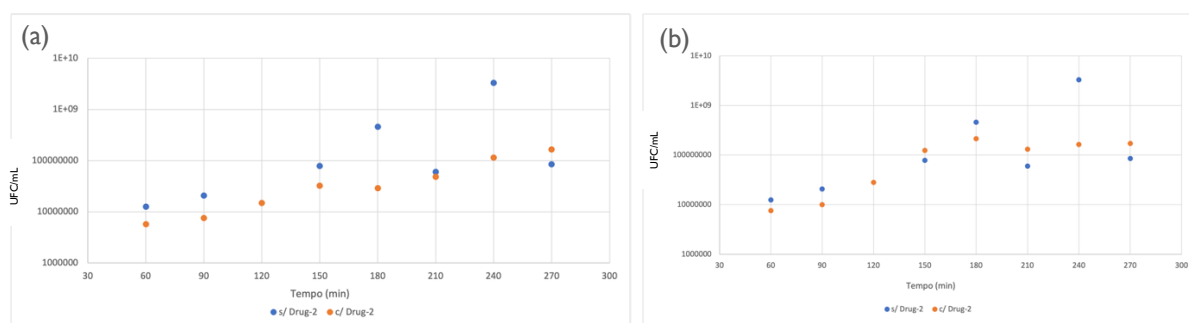


Figura 10 - Determinação de UFCs com Drug-2 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

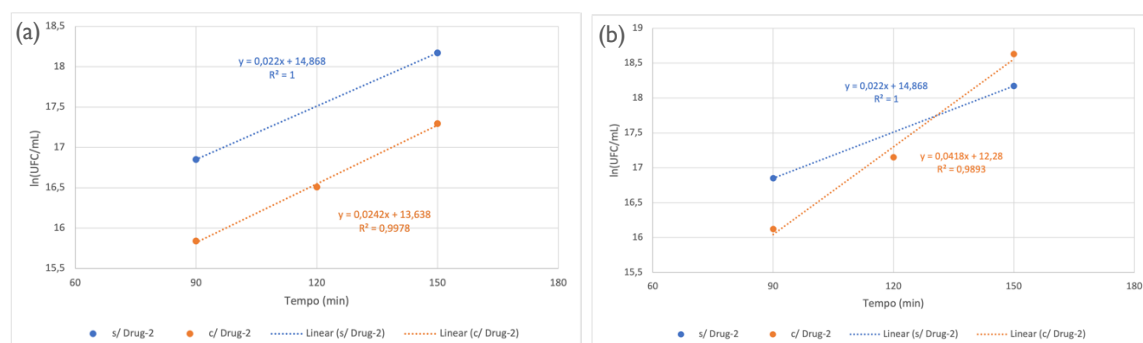


Figura 11 - Determinação da taxa de crescimento com Drug-2 (a) no início do teste (b) a meio da fase exponencial.

Tabela 3 - Taxas de Crescimento relativas aos testes de determinação de UFCs.

T(x)	Sem Drug-1	Drug-1	Sem Drug-2	Drug-2
T0	0,0303%	0,0632%	0,022%	0,0242%
T4	0,0308%	0,0293%	0,022%	0,0418%

No caso das bactérias na ausência de Drug-2, houve tempos onde os valores obtidos não se encontraram entre as 30 e as 300 UFCs para permitir contagem, como aos 120min. Comparando os resultados obtidos para os testes sem Drug-2 com os obtidos nos testes sem

Drug-1, era de esperar que o valor obtido aos 210min tivesse sido superior ao obtido tanto nos 180min como nos 240min.

Ao contrário dos resultados com o Drug-1, na curva de crescimento de UFCs para os testes com Drug-2 não se registou um aumento significativo do crescimento bacteriano mesmo após os 180min, tendo permanecido, sim, mais linear.

Mais ainda, estas curvas de crescimento para Drug-2 apresentam uma fase exponencial menos pronunciada quando comparada com os testes com adição de Drug-1.

Ainda assim, os dois compostos apresentaram taxas de crescimento superiores aos testes sem a sua adição, à exceção do teste com adição de Drug-1 no T4, onde se obtiveram valores inferiores, 0,0293 para 0,0308%, respetivamente.

3.3. Comparação dos dados obtidos

De acordo com os resultados obtidos na determinação de DO, observou-se uma redução no crescimento bacteriano mais visível para o Drug-1 do que para o Drug-2. Além disso, esta redução também parecia vir a verificar-se mais acentuada nos testes com a adição dos fármacos no início relativamente àqueles que tiveram sua adição a meio da fase exponencial.

Através da determinação das UFCs verificou-se que para o Drug-1 os resultados foram semelhantes entre os testes realizados com a adição no T0 e no T4, não tendo sofrido o efeito inicialmente previsto pela determinação da DO. Além disso, com a determinação da taxa de crescimento, verificou-se que o crescimento foi superior com a adição de Drug-1. Estes resultados evidenciam, ainda, a possibilidade de o fármaco ter auxiliado a sobrevivência e replicação das bactérias pelos valores mais elevados para a amostra contendo Drug-1.

No caso do Drug-2, os resultados para a determinação de DO são concordantes com os obtidos na determinação das UFCs, evidenciando uma redução ligeira no crescimento bacteriano. Apesar destes dados, na determinação das taxas de crescimento observou-se que, o mesmo não se verificou, tendo os testes com adição de Drug-2 no T0 e T4, 0,0242% e 0,0418%, respetivamente, sido superiores aos sem a sua adição, 0,022%. No teste com a adição no T4, a taxa de crescimento foi bastante superior aos outros valores registados para o mesmo fármaco.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi analisada a capacidade de atividade antibacteriana de duas moléculas em estudo na presença de *A. baumannii* bem como a fase do seu crescimento bacteriano onde estes compostos apresentam maior eficácia.

Os resultados obtidos com a determinação de DO e respectivas taxas nos testes com adição de Drug-1 e Drug-2 no T0 demonstraram atividade antibacteriana por parte destes compostos, tendo sido mais saliente para Drug-1. O mesmo não se registou quando a sua adição foi realizada em T4, com taxas de crescimento superiores.

Quando se procedeu à contagem de UFCs, os dados recolhidos indicam uma maior taxa de crescimento bacteriano em todos os testes realizados à exceção do teste com adição de Drug-1 a meio da fase exponencial.

No entanto, pela análise dos gráficos relativos aos testes realizados com Drug-2, a atividade antibacteriana deste fármaco, pode ter tido efeito na fase de desaceleração, uma vez que as curvas se encontram mais achatadas quando comparadas com os restantes gráficos.

A bactéria utilizada neste estudo, *A. baumannii*, é resistente às perturbações causadas pelo H₂S e pelas espécies reativas de enxofre (RSS) pela codificação de mecanismos regulatórios responsáveis pela desintoxicação de sulfetos e eliminação de RSS. Estes mecanismos permitem a manutenção do fluxo respiratório enquanto limitam a absorção de enxofre por outras fontes, mantendo o equilíbrio *redox* (Walsh *et al.*, 2020).

As concentrações de H₂S são um fator de extrema relevância para a ação que este gasotransmissor vai desempenhar sobre as bactérias. Neste protocolo a concentração final destas moléculas utilizada foi de 0,1 mM o que pode ter influenciado a concentração de de H₂S libertada. Dependendo desta, pode ter ação citoprotetora ou citotóxica (Ng *et al.*, 2020; Shimizu e Masuda, 2019).

A capacidade regulatória de *A. baumannii* bem como as concentrações libertadas de H₂S poderão ter sido fatores influenciadores da diferente ação desempenhada pelos fármacos. Para a avaliação destes fatores devem ser realizados de testes adicionais, bem como a atividade desempenhada destas moléculas na presença de bactérias produtoras de H₂S.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURET, Andre G. *et al.* - Effects of Hydrogen Sulfide on the Microbiome: From Toxicity to Therapy. *Antioxidants and Redox Signaling*. 36:4–6 (2022) 211–219. doi: 10.1089/ars.2021.0004.
- CARVALHEIRA, Ana; SILVA, Joana; TEIXEIRA, Paula - *Acinetobacter* spp. in food and drinking water – A review. *Food Microbiology*. (2020). doi: 10.1016/j.fm.2020.103675.
- CDC - Antibiotic resistance threats in the United States. Atlanta, Georgia. (2019) 67. doi: 10.15620/cdc:82532.
- CHIRINDOTH, Swathy S.; CANCAREVIC, Ivan - Role of Hydrogen Sulfide in the Treatment of Fibrosis. *Cureus*. (2021). doi: 10.7759/cureus.18088.
- HOWARD, Aoife *et al.* - *Acinetobacter baumannii* An emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 3:3 (2012) 5. doi: 10.4161/viru.19700.
- IBRAHIM, Susan *et al.* - Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. *Molecular Biology Reports*. 48:10 (2021) 6987–6998. doi: 10.1007/s11033-021-06690-6.
- MOTTA, Jean Paul *et al.* - Hydrogen sulfide protects from colitis and restores intestinal microbiota biofilm and mucus production. *Inflammatory Bowel Diseases*. 21:5 (2015) 1006–1017. doi: 10.1097/MIB.0000000000000345.
- NG, Say Yong *et al.* - Hydrogen Sulfide Sensitizes *Acinetobacter baumannii* to Killing by Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*. 11:2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01875.
- POWELL, Chadwick R.; DILLON, Kearsley M.; MATSON, John B. - A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochemical Pharmacology*. 149:2018 110–123. doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.014.
- SHATALIN, Konstantin *et al.* - H₂S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria. *Science*. 334:6058 (2011) 986–990. doi: 10.1126/science.1209855.
- SHIMIZU, Takayuki; MASUDA, Shinji - Persulphide-responsive transcriptional regulation and metabolism in bacteria. *The Journal of Biochemistry*. (2019). doi: 10.1093/jb/mvz063.
- SMALLWOOD, Miranda J. *et al.* - Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 125:2018 3–14. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.086.

WALSH, Brenna J. C. *et al.* - The response of *acinetobacter baumannii* to hydrogen sulfide reveals two independent persulfide-sensing systems and a connection to biofilm regulation. *mBio*. 11:3 (2020) 1–18. doi: 10.1128/mBio.01254-20.

WHO - WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, atual. 27 fev. 2017. [Consult. 12 jun. 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

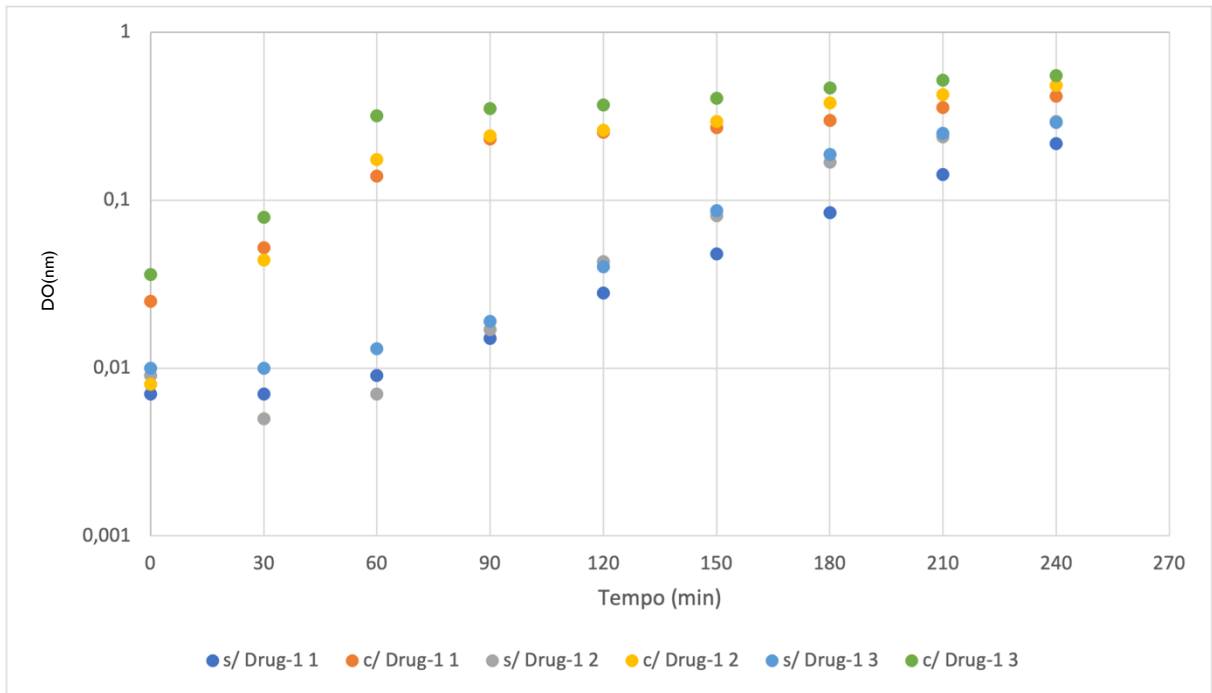
ZHAO, Shizhen *et al.* - Hydrogen Sulfide Plays an Important Role in Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9:2021. doi: 10.3389/fcell.2021.627336.

ZHU, Yi-Chun - *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1315 *Advances in Hydrogen Sulfide Biology* Disponível em: <http://www.springer.com/series/5584>>. ISBN 978-981-16-0990-9.

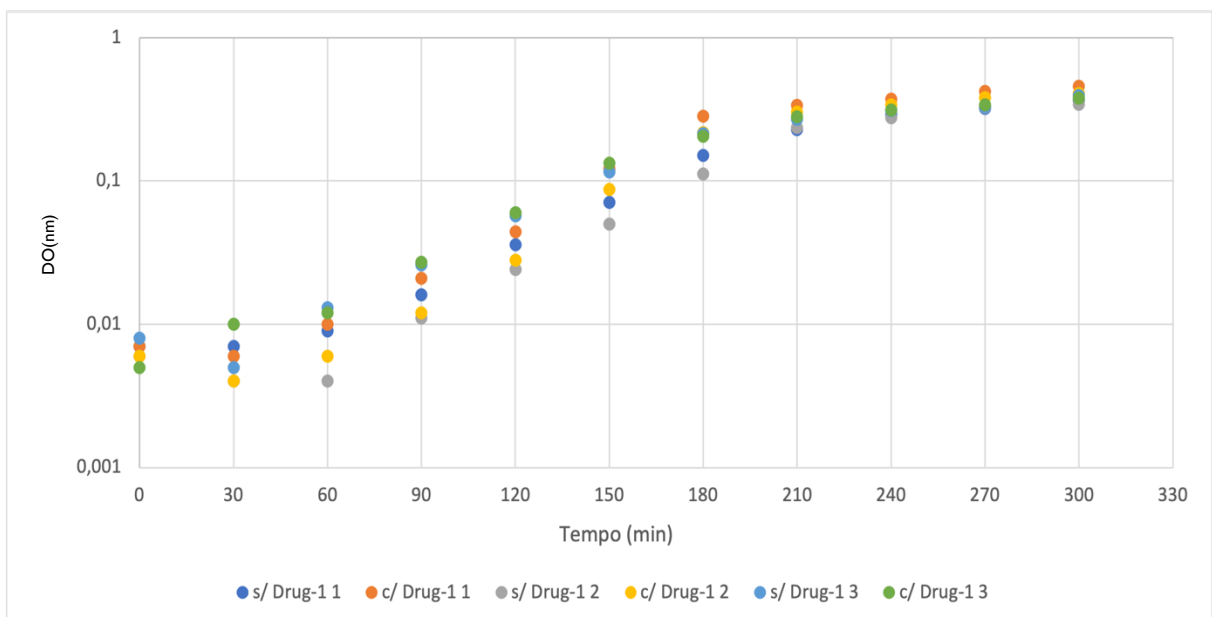
Anexos

Anexo I – Determinação da DO para Drug-I

Anexo I.1 – Determinação dos valores de DO para os três testes com adição de Drug-I no início

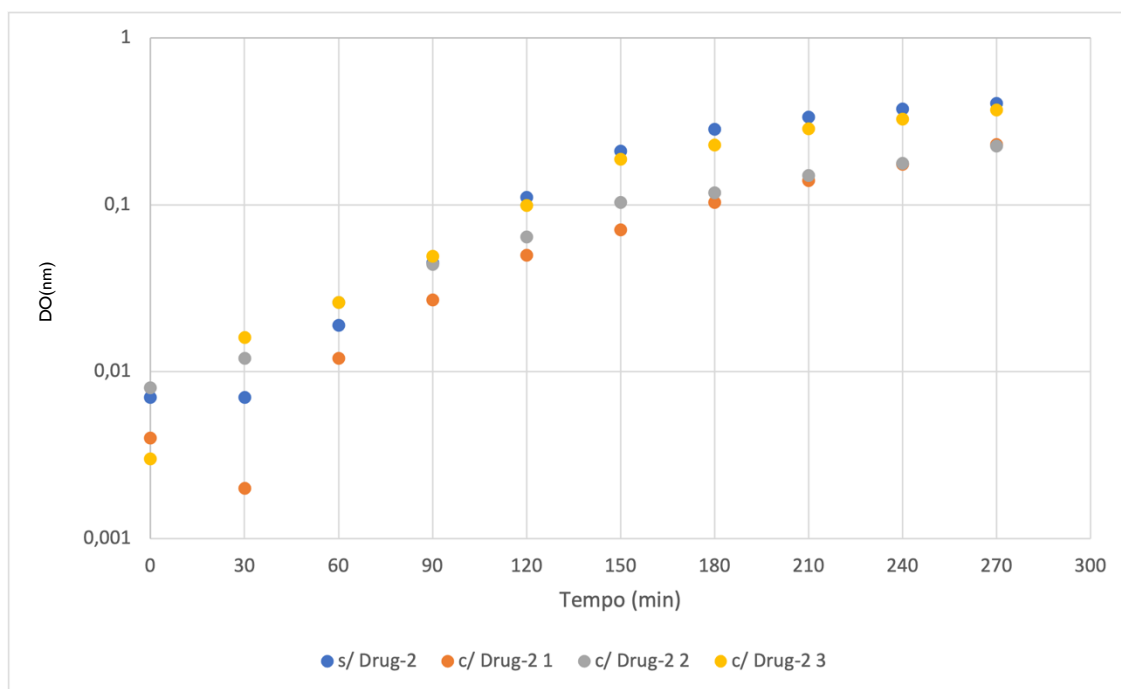


Anexo I.2 – Determinação dos valores de DO para os três testes com adição de Drug-I no meio da exponencial

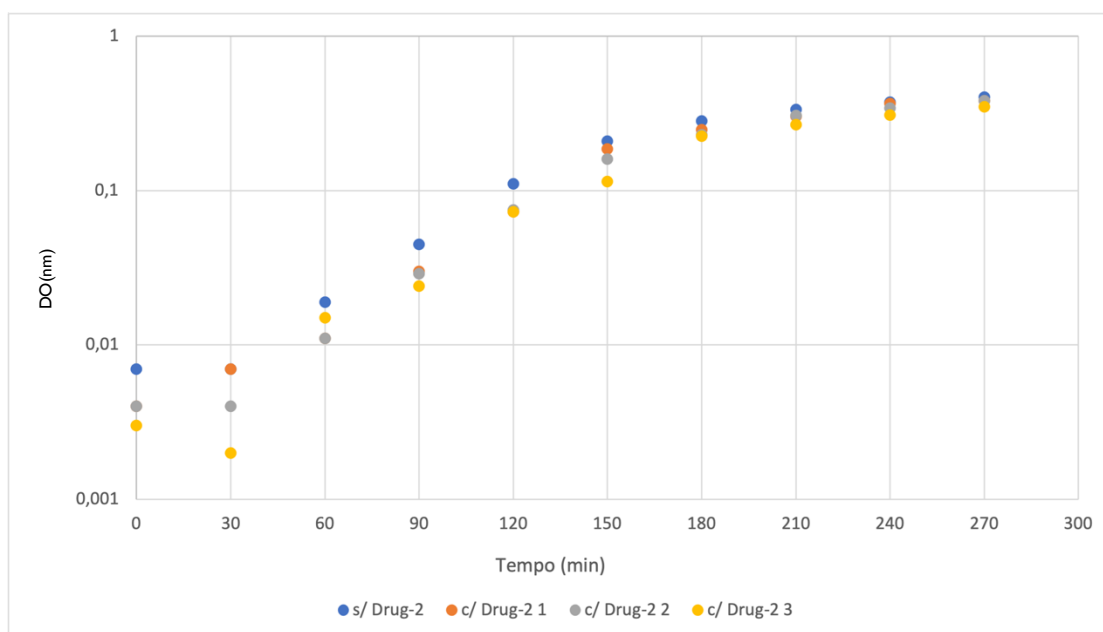


Anexo 2 – Determinação da DO para Drug-2

Anexo 2.1 – Determinação dos valores de DO para os três testes com adição de Drug-2 no início

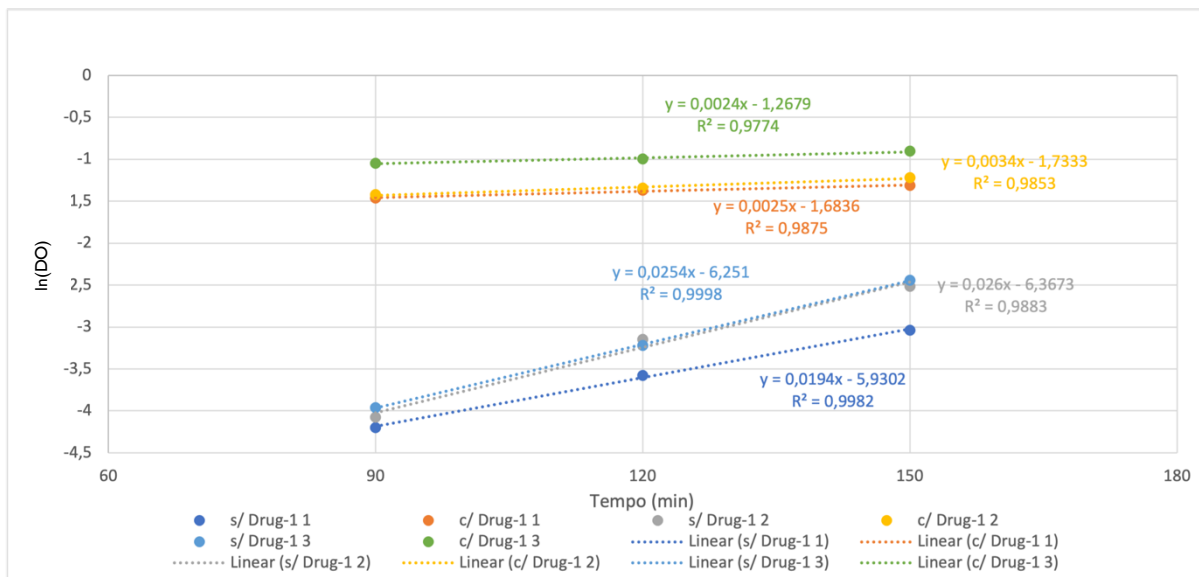


Anexo 2.2 – Determinação dos valores de DO para os três testes com adição de Drug-2 no meio da exponencial

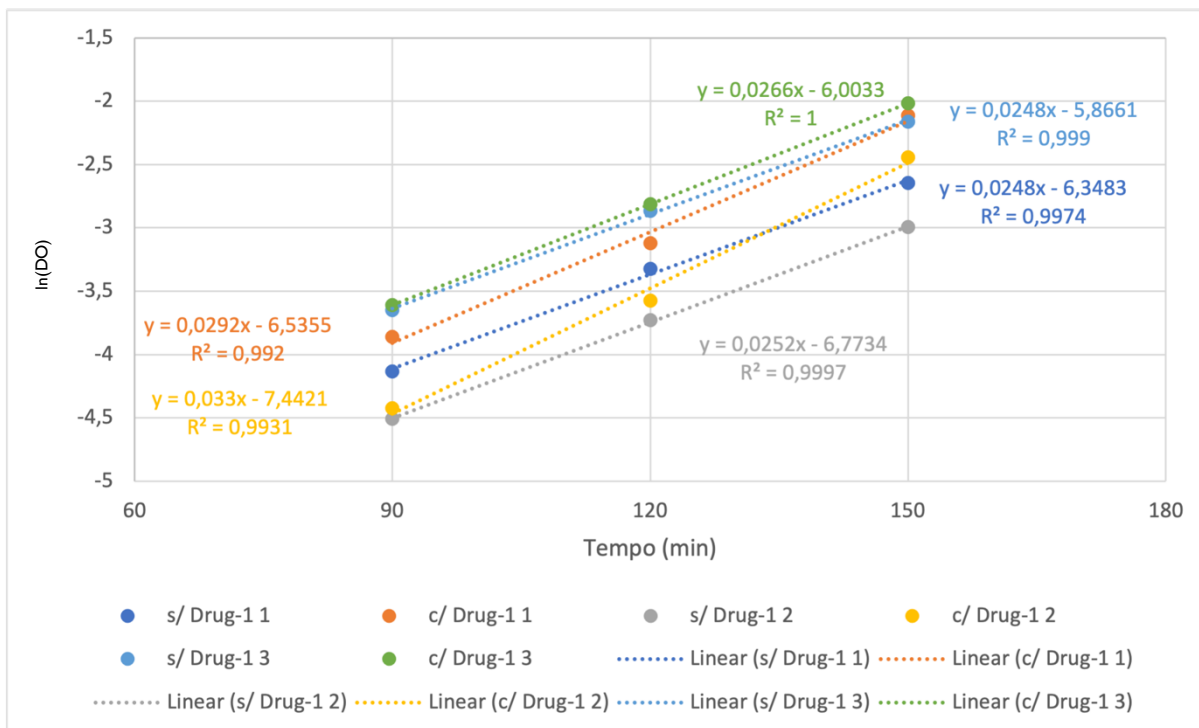


Anexo 3 – Taxas de Crescimento para Drug-I

Anexo 3.1 – Determinação das taxas de crescimento com adição de Drug-I no início

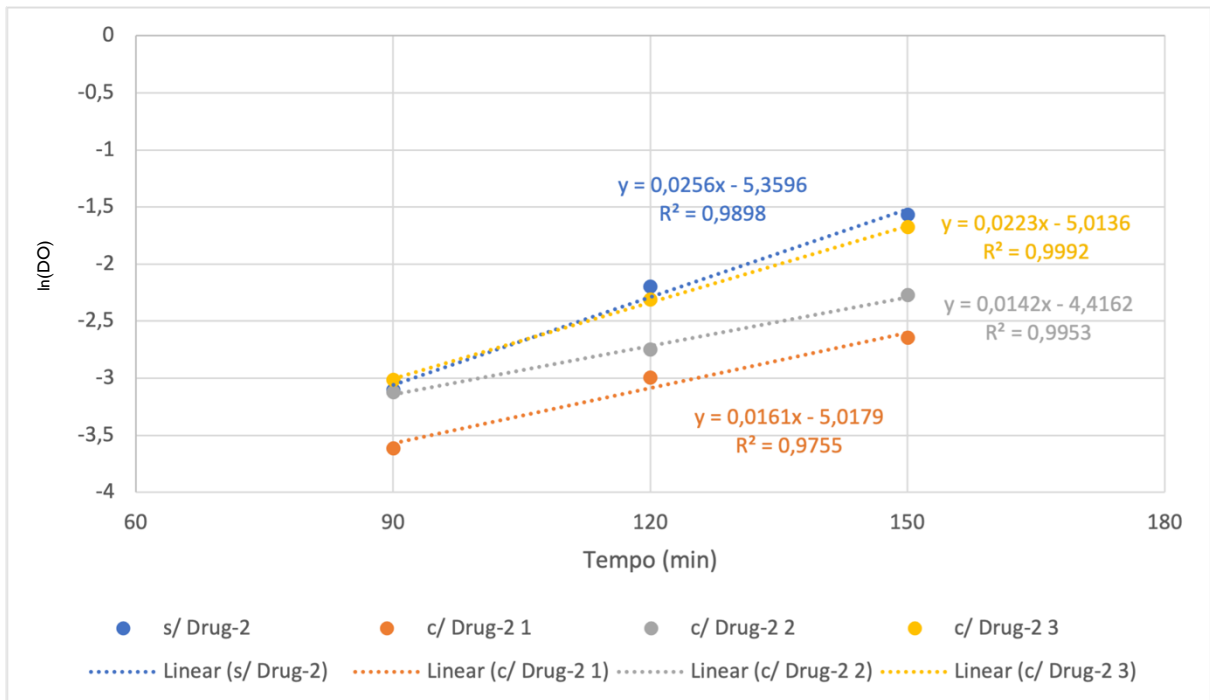


Anexo 3.2 – Determinação das taxas de crescimento com adição de Drug-I a meio da exponencial

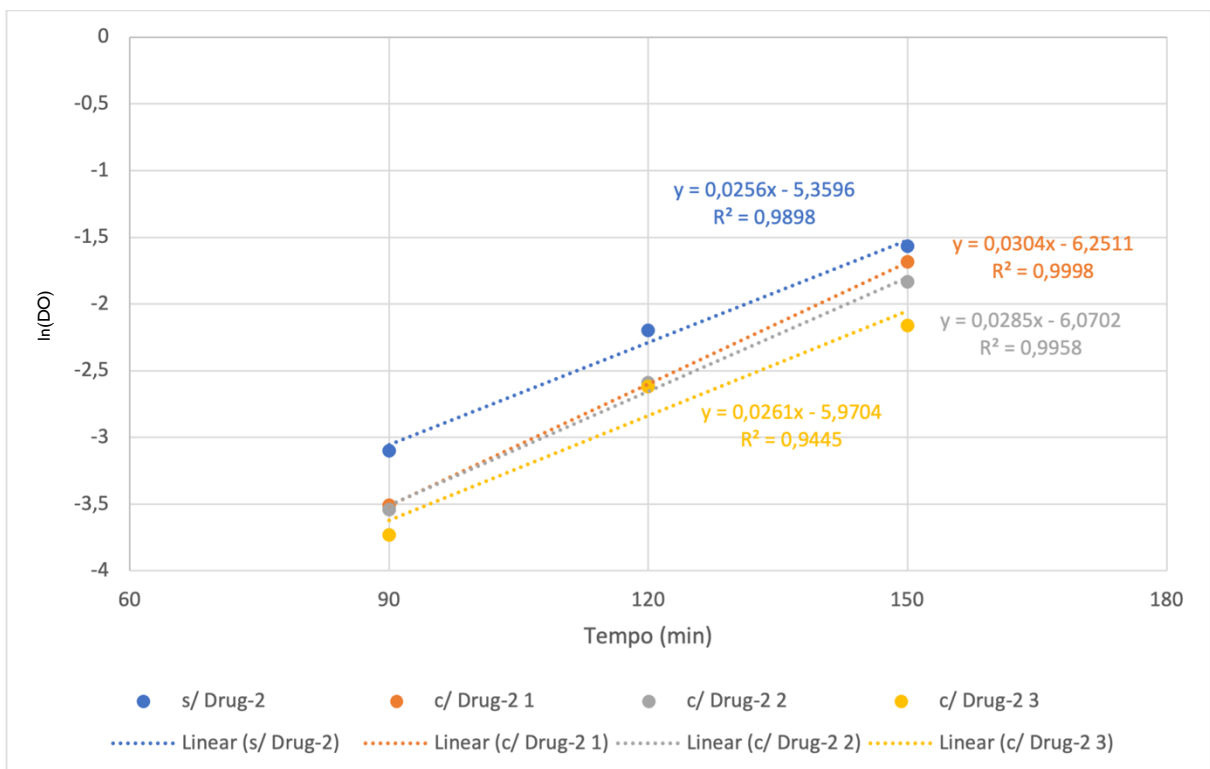


Anexo 4 – Taxas de Crescimento para Drug-2

Anexo 4.1 – Determinação das taxas de crescimento com adição de Drug-2 no início

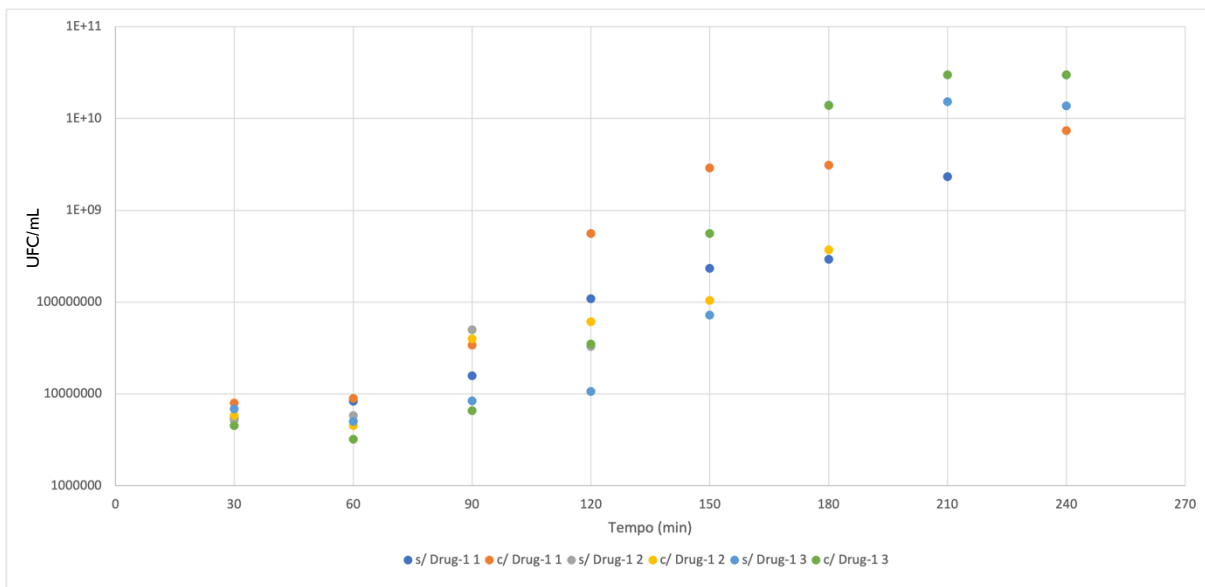


Anexo 4.2 – Determinação das taxas de crescimento com adição de Drug-2 a meio da exponencial

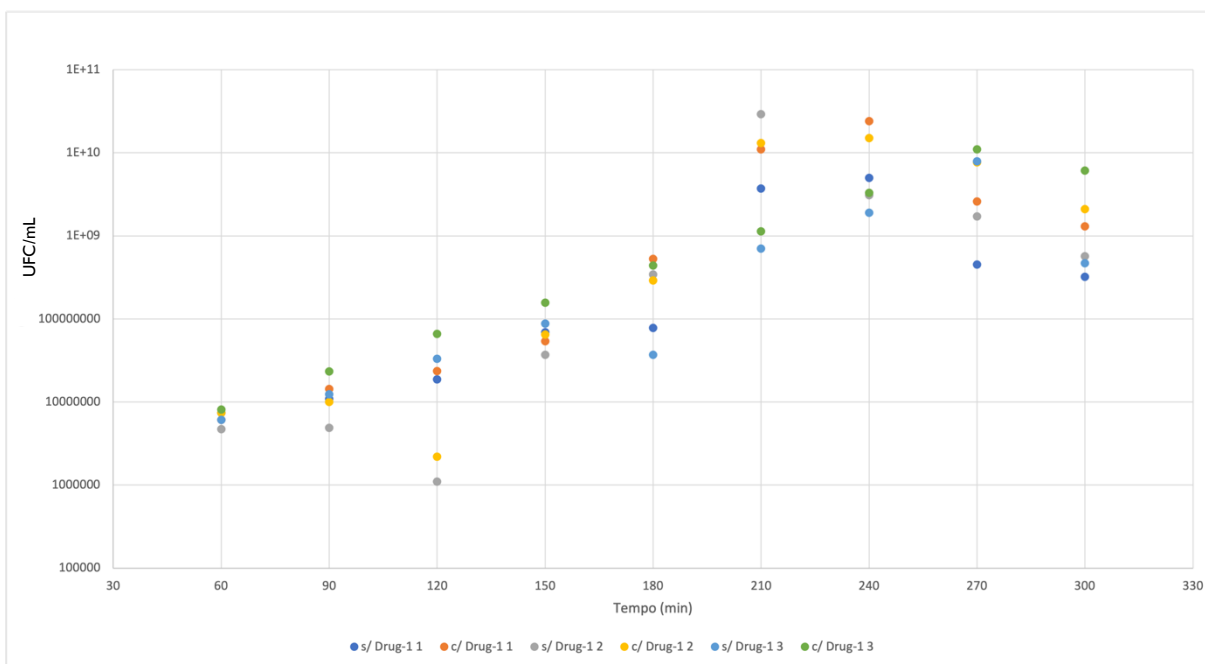


Anexo 5 – Determinação de UFCs para Drug-I

Anexo 5.1 – Determinação de UFCs com adição de Drug-I no início

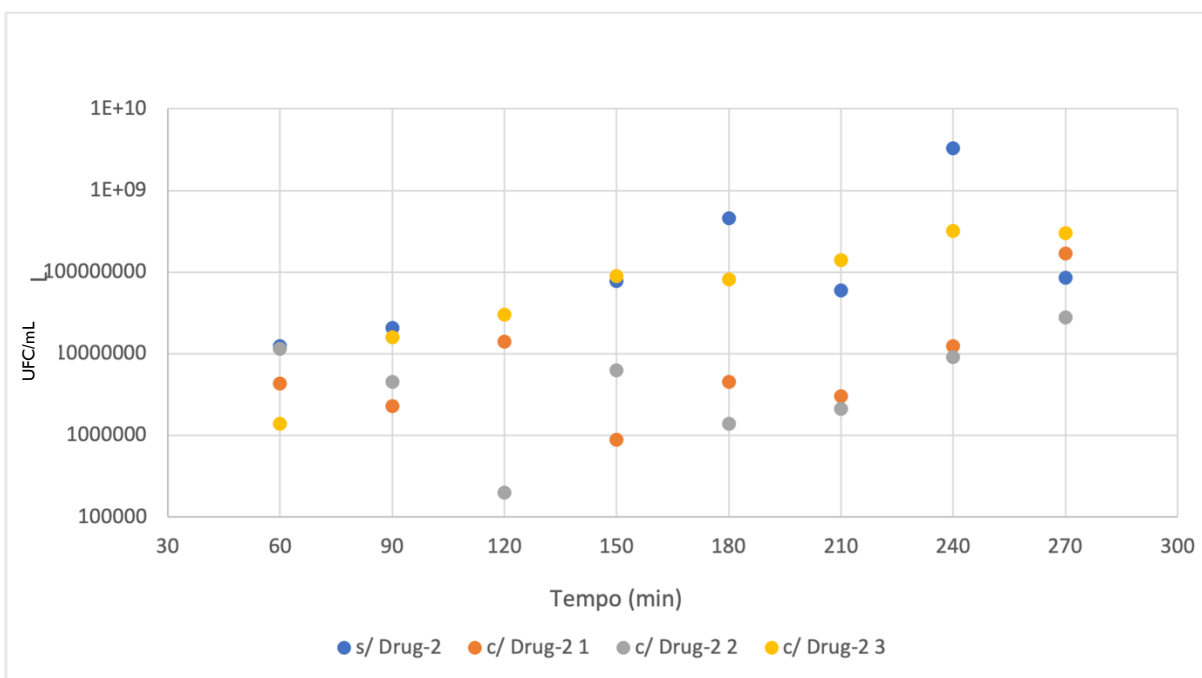


Anexo 5.2 – Determinação de UFCs com adição de Drug-I a meio da exponencial

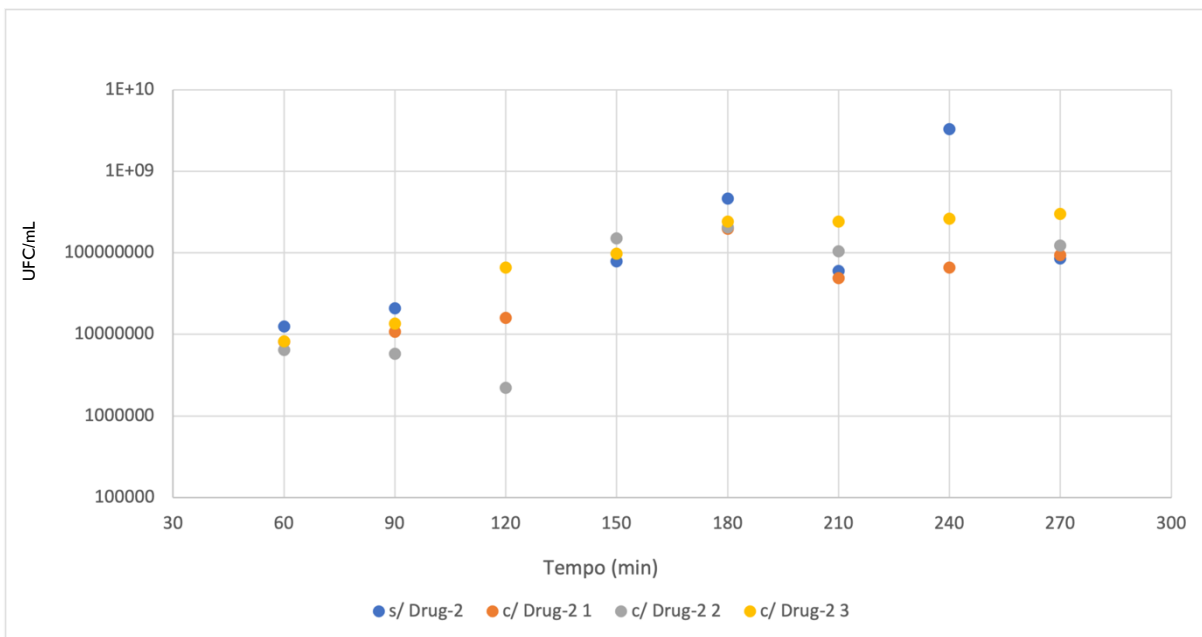


Anexo 6 – Determinação de UFCs para Drug-2

Anexo 6.1 – Determinação de UFCs com adição de Drug-2 no início



Anexo 6.2 – Determinação de UFCs com adição de Drug-2 a meio da exponencial



Parte III

**“Epidemiologia de Carbapenemases em Portugal numa
Perspetiva de “One Health””**

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Aminoácido

ATBs – Antibióticos

CHDLs – *Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases*

CRE – *Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae*

DDD – Doses Diárias Definidas

ECDC – *European Center for Disease and Prevention Control*

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ESBLs – β -Lactamases de Largo Espectro

DGS – Direção Geral de Saúde

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

GES – *Guiana Extended Spectrum*

GIM – *German Imipenemase*

IMI/NMC-A – *Imipenem-hydrolysing β -lactamase/Non-MetalloCarbapenemase-A*

IMP – Active on *Imipenem*

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*

LPS – Lipopolissacarídeos

MBLs – Metallo- β -Lactamases

NDM – *New Delhi Metallo- β -Lactamase*

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMP – *Outer Membrane Protein*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OXA – *Oxacillin-hydrolyzing*

PBPs – Proteínas de Ligação à Penicilina

PPCIRA – Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos

SFC – *Serratia Fonticola Carbapenemase*

SME – *Serratia marcescens enzyme*

SPM – São Paulo Metallo- β -lactamase

VIM – *Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase*

Resumo

Os carbapenemos são uma classe de antibióticos (ATBs) β -lactâmicos capazes de inibir a formação da parede celular. Pela sua utilização ao longo do tempo, permitiu que as bactérias adquirissem mecanismos de resistência, como carbapenemases.

Estas enzimas podem ser classificadas sobre um sistema de classificação descrito por Ambler, onde se inserem nas classes A, B e D. Nas classes A e D as carbapenemases apresentam serina no seu centro ativo e na classe B podem apresentar um ou dois íons de zinco. Na classe A salientam-se as IMI/NMC-A, SME, SFC-I, KPC e GES, na classe B as NDM-I, IMP e VIM e na classe D as OXA.

Têm sido identificadas principalmente em *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estas bactérias produtoras de carbapenemases têm recebido especial atenção por parte de organizações mundiais. Estas englobam a Organização Mundial de Saúde (OMS), Centro de Prevenção e Controlo de Doenças (CDC) e Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) têm vindo a tentar criar estratégias de forma a ultrapassar este problema de saúde pública e reduzir o seu impacto nas populações afetadas.

Palavras-chave: Carbapenemo; One Health; Antibiótico; Carbapenemase; Resistência; β -lactâmico; β -lactamase.

Abstract

Carbapenems are a class of β -lactams antibiotics (ATBs) that inhibit the cell wall formation. Its use in the past decades, gave time to the bacteria to develop resistance mechanisms such as carbapenemases activity.

These enzymes can be classified by a classification system proposed by Ambler, where are presented in classes A, B e D. In classes A and D, the carbapenemases have serine in their active site and in class B one or two zinc ions. Considering class A, their most important carbapenemases are IMI/NMC-A, SME, SFC-I, KPC e GES, in class B, the respective carbapenemases are NDM-I, IMP e VIM and in class D, they are the carbapenemases that belong to the OXA family.

These classes of carbapenemases are most commonly found in some specific species of bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. These carbapenemase-producing bacteria have been gaining special attention from different organizations around the world. World Health Organization (WHO), Center for Disease Control and Prevention (CDC) and European Center for Disease Control and Prevention (ECDC) have been developing strategies with the goal to overcome this public health problem and reduce its impact in the populations affected by this concern.

Keywords: Carbapenem; One Health; Antibiotic; Carbapenemase; Resistance; β -lactam; β -lactamase.

I. INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana, é um problema emergente que afeta não só humanos, mas também animais e ambiente. As suas causas podem ser variadas, podendo ser intrínsecas às bactérias ou então adquiridas (Wencewicz, 2019).

Os carbapenemos apresentam um papel bastante relevante nos casos de infeções causadas por bactérias resistentes à maioria dos β -lactâmicos mais utilizados, fluoroquinolonas, e aminoglicosídeos (Nicolau, 2008). Têm capacidade de lisar a maioria das bactérias, apesar de apresentar melhor atividade contra bactérias Gram-negativas (Hrenovic, Ganjto e Goic-Barisic, 2017).

Desde o início dos anos 2000, tem-se verificado um aumento do número de bactérias produtoras de carbapenemases bem como a sua disseminação, apenas existindo uma pequena quantidade de antibióticos (ATBs) disponíveis para estes casos (Gorgulho *et al.*, 2020). Dada esta escassez de novos ATBs, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou, em 2017, uma lista referente às bactérias com necessidade extrema de desenvolvimento de novos fármacos (WHO, 2017).

A estratégia de combate a este problema é complexa e bastante exigente, uma vez que a utilização de ATBs de forma indevida ou desnecessária ocorre nos diversos setores (humano, animal, agricultura). Então, em articulação com diversas entidades, foi criada a iniciativa “One Health”, designada em Portugal como “Uma Só Saúde”. Nesta abordagem, a saúde humana e animal bem como os setores de agricultura e produção alimentar e do ambiente, dos diversos países, trabalham em conjunto na tentativa de dar resposta aos desafios decorrentes da resistência antimicrobiana (Collignon e McEwen, 2019; One Health Commission, 2022).

Nesta monografia pretende-se reportar o panorama atual de Portugal, na sua progressão na resistência aos carbapenemos, tanto na prática clínica como na presença em ambiente, e medidas a ser tomadas de modo a atingir estes objetivos de forma mais rápida.

I.1. Bactérias e a sua parede celular

As bactérias encontram-se em diversos meios, desde o corpo humano e solos, e até no fundo dos oceanos (Su e Zhang, 2021). De modo a sobreviverem nestes ambientes com características tão distintas, apresentam diversos mecanismos de defesa, muitos deles associados à sua morfologia. A sua maioria apresenta uma parede celular que rodeia o exterior da membrana plasmática, mantendo a pressão osmótica intracelular e evitar lise celular, contribuindo para a sua sobrevivência. De acordo com as características da parede celular podem ser diferenciadas em Gram-positivas e Gram-negativas (Lupoli *et al.*, 2012).

A parede celular é essencial para o crescimento e desenvolvimento das bactérias e é constituída por peptidoglicano, que promove a sua estabilidade mecânica rígida. Por este motivo são um bom alvo para atuação dos ATBs, comprometendo a estrutura celular e, com isto, a viabilidade das bactérias (Fisher e Mobashery, 2020). Nas bactérias Gram-positivas esta camada é espessa, ao passo que nas Gram-negativas é fina (Aurilio *et al.*, 2022).

As bactérias Gram-negativas, externamente à camada de peptidoglicano, apresentam uma membrana externa com função de barreira protetora. Nesta encontram-se vários constituintes como lipopolissacarídeos (LPS), fosfolípidos e diferentes proteínas como as “Outer Membrane Proteins” (OMPs)(Silhavy, Kahne e Walker, 2010). Esta membrana constitui um dos principais fatores de resistência a vários ATBs como os β -lactâmicos (Breijyeh, Jubeh e Karaman, 2020).

Estas últimas são ubíquas na natureza, podendo causar infecções em diferentes órgãos e sistemas do corpo humano, tais como no trato urinário, respiratório inferior, intestinal e na corrente sanguínea. São ainda, a fonte mais comum de infecções nosocomiais (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012).

1.2. Antibióticos

Os ATBs foram definidos como substâncias químicas produzidas por microrganismos que possuem propriedades bactericidas e bacteriostáticas, podendo ter origem natural, (produzidos pelas bactérias), sintética (formuladas laboratorialmente) ou semi-sintética (derivados de ATBs naturais, mas com características ligeiramente diferentes e vantajosas) (Lima *et al.*, 2020). Foram introduzidos na prática clínica para o tratamento de doenças infecciosas e de forma a permitir vários procedimentos médicos, como transplante de órgãos e operações de coração aberto (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019).

A “Golden-Age” do desenvolvimento de ATBs iniciou-se pela descoberta da penicilina em 1928 e teve o seu pico nos anos 50. A partir daí, esta descoberta e desenvolvimento de ATBs começou gradualmente a diminuir em simultâneo com o aumento das resistências, o que levou à atual crise de resistência antimicrobiana (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019).

As duas grandes razões para este declínio passam pela maior dificuldade na identificação de novas classes de fármacos e pelos custos elevados associados ao seu desenvolvimento (Spagnolo, Trujillo e Dennehy, 2021). Isto porque já se encontram descritos ATBs que atuam na função da membrana celular (daptomicina), na biossíntese de ácidos gordos (platensimicina), inibem a síntese proteica (aminoglicósidos, macrólidos, tetraciclina) e a síntese da parede celular (β -lactâmicos, glicopeptídeos) (Peterson e Kaur, 2018; Wilson e Török, 2018).

2. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os antibióticos β -lactâmicos têm ação bactericida e na sua base encontra-se um anel β -lactâmico. De acordo com a sua posição na estrutura, pode ser dividida em quatro principais subgrupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams (Fig.1) (Egorov, Ulyashova e Rubtsova, 2020).

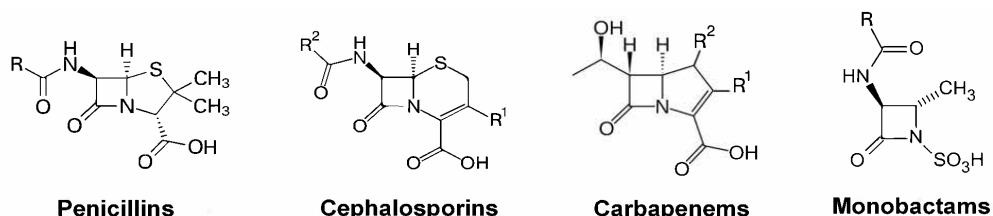


Figura 12 – Estrutura dos grupos de antibióticos β -lactâmicos (Adaptado de (Egorov, Ulyashova e Rubtsova, 2020))

Além destes, existe os inibidores das β -lactamases, que atuam inibindo as β -lactamases que têm serina no seu centro ativo. Estas enzimas têm capacidade de hidrolisar e inativar o anel dos ATBs β -lactâmicos (Pandey e Cascella, 2022).

2.1. Mecanismo de ação

A camada de peptidoglicano das bactérias Gram-negativas apresenta na sua estrutura resíduos terminais de aminoácidos (AA) denominados de D-alanil-D-alanina. Estes AA são relevantes na formação da parede celular das bactérias e apresentam estruturas idênticas à dos β -lactâmicos, como visível na Figura 2 com a utilização da penicilina como exemplo destes fármacos (Lima et al., 2020).

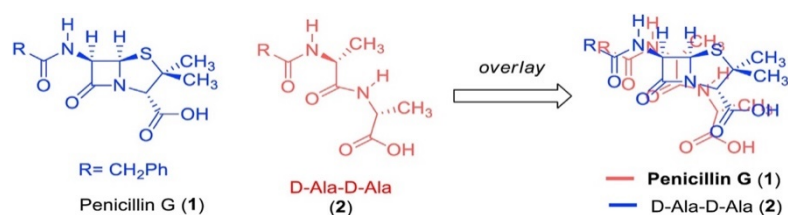


Figura 13 – Semelhanças estruturais entre um β -lactâmico (penicilina) e a D-alanil-D-alanina. (Adaptado de (Fisher e Mobashery, 2020; Lima et al., 2020).)

Esta semelhança estrutural permite mimetização da sua ação, inibindo a síntese da camada de peptidoglicano, não se concluindo a formação da parede celular (Tulane University, 2015). Esta inibição ocorre com a ligação do β -lactâmico ao local ativo da transpeptidase, como visível na Figura 3. Esta ligação, que é irreversível, é facilitada pelas proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (Nordmann, Dortet e Poirel, 2012).

As PBPs são macromoléculas “*membrane-associated*” com funções relevantes no processo de síntese da parede celular, principalmente pela sua atividade catalítica na formação do peptidoglicano (Fig. 3) (Costa, da *et al.*, 2018).

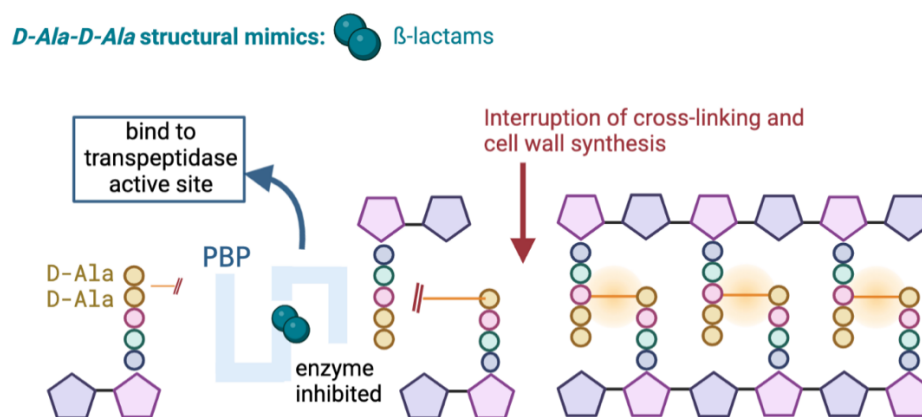


Figura 14 – Mecanismo de ação dos β -lactâmicos

São, por isso, bons alvos para a atuação de ATBs, pois pela sua ligação conseguem reduzir significativamente a quantidade de ligações cruzadas de peptidoglicano, resultando em lise bacteriana (Macheboeuf *et al.*, 2006).

2.1.1. Carbapenemos

A escolha de um ATB em detrimento de outro, é determinada de acordo com as suas propriedades farmacológicas, espectros de atividade e perfis de segurança, uma vez que apresentam eficácias diferentes para bactérias específicas. Os carbapenemos, têm maior capacidade de ação contra bactérias Gram-negativas comparativamente a outros ATBs β -lactâmicos (Nicolau, 2008).

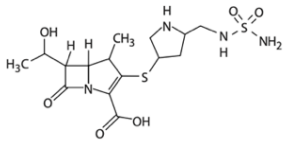
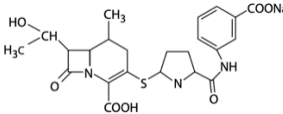
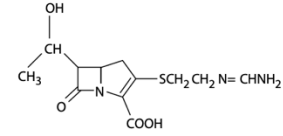
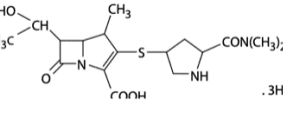
Estruturalmente, têm um anel de cinco membros semelhante ao da penicilina, onde o átomo de enxofre inserido em C-1 está substituído por um átomo de carbono e, com isto, criando uma dupla ligação em C-2 e C-3 e numa posição trans, o que lhes confere resistências às β -lactamases (Aurilio *et al.*, 2022).

Os carbapenemos ligam-se a diferentes PBPs impedindo a síntese da parede celular danificando a própria parede celular, que ao ficar incompleta, resulta frequentemente em lise celular (Nicolau, 2008). Na Tabela I encontram-se representados os diferentes carbapenemos e as PBPs para as quais têm afinidade e inibem, sendo as principais as PBP1a, 1b, 2 e 3. No caso da inibição da PBP2, induzem a formação de esferoplastos não filamentosos, levando a uma rápida morte celular. A inibição da PBP3 produz, na sua generalidade, formas filamentosas (Breilh *et al.*, 2013).

Esta subclasse de ATBs tem demonstrado uma atividade com elevada potência atividade potente uma contra uma variedade de bactérias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, são sendo resistentes à hidrólise provocada pela maioria das β -lactamases (Bush, 2010). Alguns ainda têm capacidade inibitórias sobre estas enzimas, pelo que são utilizadas como tratamento empírico nestas situações (Hansen, 2021; Iovleva e Doi, 2017).

Além da sua utilização como primeira linha de tratamento nos casos de resistência, ou multirresistência, como infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae*, também podem ser aplicados no tratamento de infecções mistas aeróbias e anaeróbias, estirpes de pneumococos não suscetíveis à penicilina (Aurilio et al., 2022; Beauduy e Winston, 2017).

Tabela 4 – Diferentes Carbapenemos e suas características.

Carbapenemo	Peso Molecular g/mol	Estrutura	Ligação às PBPs
Doripenemo	438,52 g/mol		Liga preferencialmente à PBP2 da <i>Escherichia coli</i> e PBPs 2 e 3 da <i>P. aeruginosa</i> .
Ertapenemo	497,5 g/mol		Maior afinidade de ligação para PBPs 2 e 3 da <i>E. coli</i> ; também se liga às PBPs 1a, 1b, 4 e 5.
Imipenemo	317,37 g/mol		Preferencialmente às PBP2, seguido da PBP1a e 1b e com menor afinidade para PBP3.
Meropenemo	437,52 g/mol		Liga-se preferencialmente às PBPs 2, 3 e 4.

(Adaptada de (Finch et al., 2010))

3. RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

De acordo com a OMS, a resistência a ATBs é atualmente uma das maiores ameaças à saúde global, segurança alimentar e desenvolvimento e caracteriza-se pela capacidade de as bactérias se alteram em resposta a este tipo de fármacos (ECDC e WHO, 2022; WHOa, 2017).

No que concerne as bactérias, a resistência antimicrobiana pode ser devida a vários fatores tais como a seleção natural, pela variabilidade genética, a ocorrência de mutações,

recombinação genômica bem como transferência horizontal de gene (Bengtsson-Palme, Kristiansson e Larsson, 2018).

Os ATBs são a classe de fármacos mais comumente vendida em todo o mundo e o principal fator contribuidor para a formação de resistências (Dodds, 2017). São utilizados nas mais diversas áreas, e, muitas vezes, de forma indevida e desnecessária (Morar e Wright, 2010).

Esta resistência pode, então, ocorrer por diferentes mecanismos, sendo classificados em várias categorias de acordo com a natureza do ATB alvo e do mecanismo bioquímico de resistência (Waglechner e Wright, 2017).

3.1. Tipos de resistências

As bactérias diferem entre si e, por sua vez, na forma como resistem a vários fatores intrínsecos e extrínsecos, nomeadamente ATBs. Algumas têm capacidade de os produzir permitindo o desenvolvimento natural de mecanismos de autodefesa contra estes. Outras, não produtoras de ATBs, por interagirem no mesmo meio que as primeiras, são capazes de adquirir a mesma resistência (Peterson e Kaur, 2018).

Esta heterogeneidade entre as bactérias permite uma caracterização distinta no seu tipo de resistência. As produtoras de ATBs são geralmente consideradas como detentoras de resistência inata e as não produtoras como resistência adquirida. Além destes dois tipos de resistência existe, ainda, um terceiro tipo denominado de resistência espontânea. Neste caso a resistência ocorre genericamente através de mutações pontuais em AA na proteína alvo dos ATBs, resultantes do tratamento com ATBs de baixo pequeno molecular (Wencewicz, 2019).

3.1.1. Mecanismos de resistência

A resistência bacteriana, especificamente nos ATBs β -lactâmicos, pode ocorrer de diferentes formas, representadas na Figura 4, de acordo com o tipo de ATB e bactéria. A gama de mecanismos de resistência é independente da patogenicidade das bactérias (Morar e Wright, 2010). Esta resistência pode ocorrer por diminuição da permeabilidade da membrana por OMPs, designadas de porinas, pela presença de uma PBP com baixa afinidade para estes ATBs, bombas de efluxo e por hidrólise enzimática, promovida por β -lactamases (Breilh *et al.*, 2013; Pfeifer, Cullik e Witte, 2010).

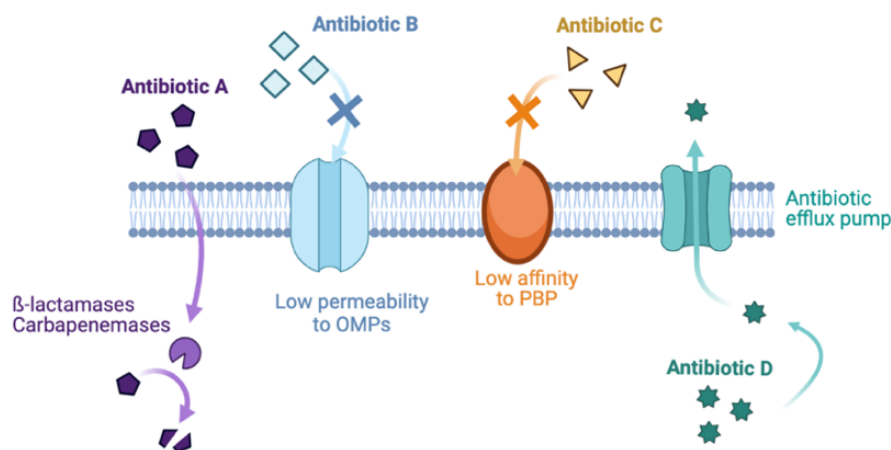


Figura 15 – Principais mecanismos de resistência aos antibióticos.

As porinas são OMPs produtoras de canais aquosos que permitem o influxo de nutrientes nas bactérias assim como o efluxo de alguns resíduos, de acordo com o seu tamanho (Nikaido, 2003). Esta característica permite que a membrana externa seja seletiva, tendo um grande impacto na suscetibilidade das bactérias aos ATBs. Neste caso, a resistência aos ATBs pode ser resultante de alterações estruturais das OMPs, que também podem estar associadas à presença de β -lactamases no periplasma (Ghai e Ghai, 2018).

Os β -lactâmicos para terem ação farmacológica ligam-se covalentemente às PBPs presentes na membrana celular (Macheboeuf *et al.*, 2006). Certas mutações podem ocorrer que levarão a uma menor afinidade das PBPs aos ATBs, seja por mutações nos genes codificadores das proteínas, nas proteínas responsáveis pelo transporte e/ou ativação destes (Opal e Pop-Vicas, 2014).

Outro mecanismo de resistência passa pela *upregulation* das bombas de efluxo. Estas têm capacidade de expelir uma grande variedade de agentes e compostos antimicrobianos para o meio externo. A sua sobre-expressão reduz a acumulação de ATBs e pode ser resultante de mutações quer pelos genes que as codificam quer pela bactéria em si estando, muitas vezes, relacionados com tratamentos recorrentes com carbapenemos (Zhang *et al.*, 2018).

4. CARBAPENEMASES

As β -lactamases são enzimas que têm como objetivo principal a inibição dos ATBs β -lactâmicos, hidrolisando o seu anel β -lactâmico. Esta hidrólise pode ser diferenciada de acordo com o tipo de β -lactâmicos presentes, tendo a maioria uma serina no centro ativo dos compostos alvo sobre a qual vão atuar ou, então, pelo auxílio de iões de zinco nos centros ativos das metalo- β -lactamases (MBLs) (Bush, 2018).

Um grande número de β -lactamases já se encontram identificadas o que gerou necessidade de as catalogar criando-se certos critérios diferenciadores de acordo com as suas propriedades funcionais e moleculares. Nestes constam o ponto isoelétrico, peso molecular, a sua atividade para diferentes β -lactâmicos, interação com inibidores, natureza do local ativo, sequência de AA e a sua estrutura tridimensional (Lima *et al.*, 2020).

Para esta categorização foram criados dois sistemas de classificação dos β -lactâmicos visíveis na Figura 5, o primeiro introduzido por Ambler, em 1980, separando inicialmente em duas classes, A e B, baseado na informação obtida por sequenciação aminoacídica e também de acordo com o tipo de mecanismo hidrolítico (Ambler, 1980). Posteriormente, foram adicionadas mais duas classes, C e D, permitindo uma melhor divisão entre β -lactamases, sendo que as classes A, C e D correspondem às que apresentam serina no centro ativo e a classe B engloba o grupo heterogéneo de β -lactamases que necessitam de zinco para desenvolver a sua ação, as MBLs (Tooke *et al.*, 2019). Já o segundo sistema, o sistema Bush-Jacoby-Medeiros, inicialmente proposto por Bush em 1988, foca-se nas características funcionais, fazendo distinção em três grandes grupos de acordo com o seu perfil de substratação e inibidor (Queenan e Bush, 2007). No grupo 1 encontram-se as cefalosporinas que não sofrem grande inibição pelo ácido clavulânico, no grupo 2 as penicilinas, cefalosporinas e β -lactamases de amplo espectro (ESBLs) que são geralmente inibidas por inibidores de β -lactamases direcionados para o local ativo. No grupo 3 estão categorizadas as MBLs que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos e que são pouco inibidas por grande parte das moléculas que contêm β -lactâmicos (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995).

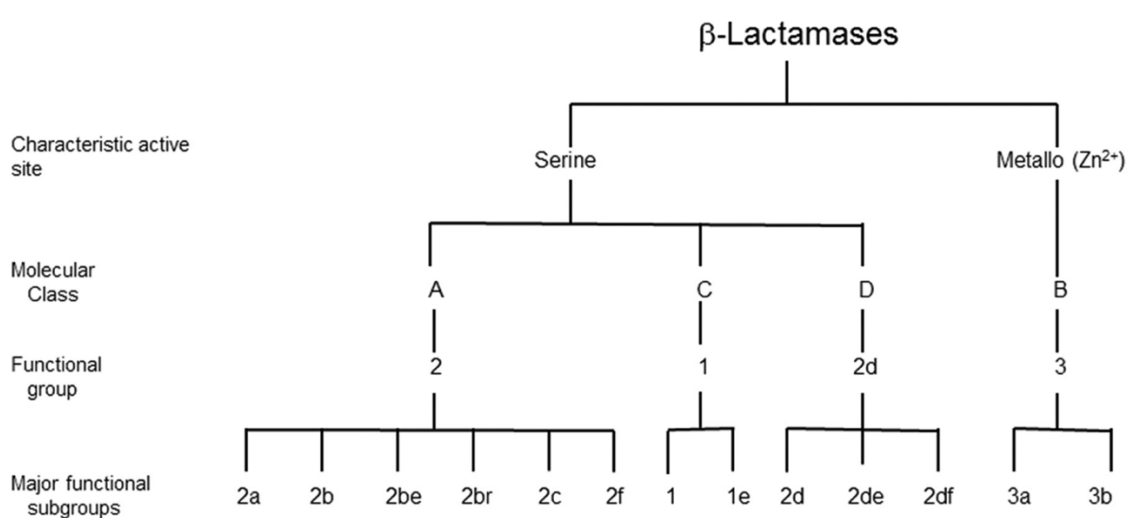


Figura 16 - Classificação das classes de ATBs β -lactâmicos. (Adaptado de (Bush, 2018))

4.1. Classificação de Ambler

As carbapenemases são β -lactamases especializadas na hidrólise de carbapenemos apesar de terem capacidade de hidrolisar praticamente todos os ATBs β -lactâmicos (Papp-Wallace et al., 2011). Estas apresentam características bem diferenciadas entre si, podendo utilizar processos de hidrólise diferentes assim com eficácias também diferentes (da Silva e Duarte, 2011).

De acordo com a Tabela 2, as carbapenemases na classificação de Ambler englobam as classes A, B e D. As classes A e D têm a serina como centro ativo e as da classe B necessitam de zinco no seu centro ativo para otimizar a sua atividade catalítica (Lima et al., 2020). Já na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros as classes A e D inserem-se no grupo 2 e a classe B no grupo 3 (Queenan e Bush, 2007).

Tabela 5 - Classificação das carbapenemases.

Classificação de Ambler	Tipo de carbapenemase	Classificação de Bush	Codificação	Carbapenemases
A	Serina- β -lactamase	2f	Cromossoma	- IMI/NMC-A ^a - SME ^b - SFC-I ^c
		2e	Plasmídeo	- KPC ^d - GES ^e
B	Metallo- β -lactamase	3		- NDM-I ^f - IMP ^g - VIM ^h
D	Serina- β -lactamase	2df		- OXA ⁱ

^aImipenem-hydrolysing β -lactamase / non-metallo carbapenemase-A, ^b*Serratia marcescens* enzyme, ^c*Serratia fonticola* carbapenemase-I, ^d*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, ^eGuiana extended spectrum, ^fNew Delhi metallo- β -lactamase I, ^gImipenemase, ^hVerona integron-encoded metallo- β -lactamase, ⁱOxacillin-hydrolyzing carbapenemases

(Adaptado de Aurilio et al., 2022; Eichenberger e Thaden, 2019; Hansen, 2021; Walther-Rasmussen e Høiby, 2006)

4.1.1. Carbapenemases classe A

Esta classe de carbapenemases foi descoberta há cerca de 20 anos e a sua ocorrência esporádica, na forma de casos isolados ou pequenos surtos acontece desde então. A sua deteção aparece, principalmente, em certas espécies bacterianas como *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, e *Klebsiella spp* (Queenan e Bush, 2007).

As carbapenemases β da classe A, representadas na Tabela 3, incluem as enzimas “Imipenem-hydrolysing β -lactamase/non-metallo carbapenemase-A” (IMI/NMC-A), “*Serratia marcescens* enzyme” (SME), “*Serratia fonticola* carbapenemase-I” (SFC-I), “*Klebsiella*

pneumoniae carbapenemases” (KPC) e “Guiana extended spectrum” (GES). Estas inserem-se no grupo 2 da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, diferenciando-se posteriormente nos seus subgrupos, tendo carbapenemases tanto no subgrupo 2f como 2e (Walther-Rasmussen e Høiby, 2007) (Tabela 2).

O seu mecanismo hidrolítico requer a presença da serina no centro ativo e têm ação num espetro alargado de β -lactâmicos, incluindo carbapenemos, penicilinas e cefalosporinas clássicas (Ambler *et al.*, 1991). Além disso são inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam sendo, então, inseridas no grupo 2f (Queenan e Bush, 2007).

De entre todas as enzimas da classe A é relevante destacar as KPCs, inicialmente descritas na *Klebsiella pneumoniae*, dado que se encontram distribuídas por todo o mundo, hidrolisando todos os β -lactâmicos (Logan e Weinstein, 2017; Tooke *et al.*, 2019). As KPCs têm potencial de se propagarem entre patógenos humanos principalmente através de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Walther-Rasmussen e Høiby, 2007).

Tabela 6 - Classificação das carbapenemases Classe A.

Enzima	Espécies	Variantes	Origem	País*
IMI^a	<i>Enterobacter cloacae</i>	23	IMI-I: EUA, 1996	EUA, China
NMC^b	<i>Enterobacter cloacae</i>	NMC-A	França, 1990	França, Argentina, EUA
SME^c	<i>Serratia marcescens</i>	5	SME-I: Inglaterra, 1982	Inglaterra, EUA
SFC^d	<i>Serratia fonticola</i>	3	SFC-I: Portugal, 2004	Portugal
KPC^e	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; também em: <i>Enterobacter spp.</i> e <i>Salmonella spp.</i>	123	KPC-I: EUA, 1996	EUA, Colômbia, Israel, França, China, Escócia
GES^f	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51	GES-I: Guiana Francesa, 2000;	Europa, África do Sul, Japão

*Países com incidência de casos isolados ou pequenos surtos

^a“Imipenem-hydrolysing β -lactamase” ^b“non-metallo carbapenemase-A”, ^c“*Serratia marcescens* enzyme”, ^d*Serratia fonticola* carbapenemase-I, ^e*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, ^fGuiana extended spectrum (GES)

(Adaptado de Bush, 2013; Cayô *et al.*, 2017; Eichenberger e Thaden, 2019; Hansen, 2021; Di Luca *et al.*, 2016; Naas *et al.*, 2017; Pfeifer, Cullik e Witte, 2010; Queenan e Bush, 2007; da Silva e Duarte, 2011; Walther-Rasmussen e Høiby, 2007)

4.1.2. Carbapenemases classe B

As carbapenemases da classe B, classificadas como MBLs, caracterizam-se pela sua capacidade de hidrolisar todos os ATBs β -lactâmicos (à exceção dos monobactâmicos) e pela sua resistência aos inibidores de β -lactamases comercializados (Pfeifer, Cullik e Witte, 2010).

Apesar desta capacidade hidrolítica, podem ser inibidos por agentes quelantes de zinco, como o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), podendo ter a sua atividade reconstituída com posterior adição de zinco (Queenan e Bush, 2007; Walsh *et al.*, 2005).

Isto acontece porque, ao contrário das carbapenemases das classes A e D, não apresentam serina no centro ativo, mas sim iões zinco (Eichenberger e Thaden, 2019). De acordo com a necessidade de uma ou duas moléculas de zinco para ter atividade catalítica, as MBLs foram divididas em duas subclasses: as B1 e B3 precisam de dois iões zinco, enquanto a subclasse B2 apenas precisa de um no seu centro ativo (Lima *et al.*, 2020).

Entre as três subclasses, a B1 apresenta, atualmente, maior relevância clínica, em parte, por se encontrarem associadas a plasmídeos móveis o que facilita a transferência dos genes de resistência entre bactérias, principalmente através de *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, e *Enterobacteriaceae* (Aurilio *et al.*, 2022; Walsh *et al.*, 2005).

As que levantam mais preocupações e que têm sido detetadas em todo mundo são a Imipenemase (IMP), “Verona integron-encoded metallo- β -lactamase” (VIM) e “New Delhi metallo- β -lactamase” (NDM). Além destas também existem MBLs com casos endémicos reportados como a “São Paulo Metallo- β -lactamase” (SPM) e “German Imipenemase” (GIM). No caso da SPM foi recentemente relatado um caso de SPM-I no Chile (Wozniak *et al.*, 2021).

A IMP-I codifica-se tanto em plasmídeos como integroes, proporcionando-lhes uma mais fácil e rápida disseminação da enzima (Cheng *et al.*, 2021). A maioria das IMP são resistentes tanto para o meropenemo como para o imipenemo (Pongchaikul e Mongkolsuk, 2022).

As VIM encontram-se principalmente associadas a *P. aeruginosa* e conseguem hidrolisar todos os β -lactâmicos à exceção dos monobactâmicos (de Barsey, *et al.*, 2021).

Já as NDMs foram mais recentemente descobertas, relativamente às anteriores e rapidamente se tornaram um problema de saúde pela sua disseminação por todo o mundo e pela sua ampla e rápida capacidade de propagação (Palzkill, 2013). Esta preocupação relativa às NDMs também se centra no facto de ainda não se ter conseguido estabelecer parâmetros referentes à sua prevalência e na incerteza da incidência na população, além das instituições prestadoras de cuidados de saúde (Wu *et al.*, 2019).

A SPM foi primeiramente isolada no Brasil em 1997 e permaneceu endémica até 2021, quando foi reportado o primeiro caso fora do Brasil, num paciente no Chile (Wozniak *et al.*, 2021). Esta enzima foi isolada *P. aeruginosa*, e tem causado diversos surtos em hospitais brasileiros e com alta taxa de mortalidade (Queenan e Bush, 2007).

Outro caso endémico reportado é da GIM-I, na Alemanha em 2002, e apresenta características semelhantes às IMPs e VIMs também encontrados em isolados de *P. aeruginosa* (Queenan e Bush, 2007; Wendel e MacKenzie, 2015).

4.1.3. Carbapenemases classe D

A classe D das carbapenemases foi inicialmente caracterizada como oxacilinas por possuírem atividade hidrolítica para a oxacilina o que lhes atribuiu a classificação de “Oxacillin-hydrolyzing carbapenemases” (OXA). Estas enzimas de forma genérica não são inibidas pelo ácido clavulânico, EDTA, tazobactam e sulbactam e muitas delas hidrolisam carbapenemos (Hansen, 2021).

Até ao momento encontram-se identificadas cerca de 1100 variantes das OXA, maioritariamente presentes em bactérias Gram-negativas e a primeira identificada foi a OXA-23 (Naas *et al.*, 2017).

Tal como as outras classes de carbapenemases, as OXA, com a presença dos ATBs β -lactâmicos no espaço periplasmático, formam uma ligação enzima-substrato, hidrolisando-os (Yoon e Jeong, 2021).

Estas enzimas podem ser diferenciadas de acordo com o seu espectro de ação em três grupos, sendo um deles destinado às OXA com atividade hidrolítica sobre os carbapenemos, denominadas de “Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases” (CHDLs). Foram, então, identificados nove subgrupos distintos descritos na Tabela 4 (Walther-Rasmussen e Høiby, 2006).

Apesar de apresentar menor atividade catalítica para os carbapenemos, a mais prevalente é a OXA-48, pois pode conferir maior resistência por poder ocorrer conjuntamente com outros mecanismos, tais como a impermeabilidade da membrana (Walther-Rasmussen e Høiby, 2006).

Tabela 7 – Grupos e subfamílias de CHDLs e sua prevalência

Grupo	Subfamília (OXA ^a)	Espécies	Origem	País*
1	OXA-23	<i>Acinetobacter spp.</i> ; <i>Pseudomonas spp.</i> ; <i>Enterobacterales</i>	Inglaterra (<i>A. baumannii</i>), 1985	Europa, Ásia, EUA, América do Sul, Austrália e África
2	OXA-24	<i>Acinetobacter spp.</i> ; <i>P. aeruginosa</i>	Espanha (<i>A. baumannii</i>), 1997	Ásia, Europa, EUA e América do Sul
3	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	Argentina, 1996	Europa, Ásia, África, Austrália, EUA e América do Sul
4	OXA-58	<i>Acinetobacter spp.</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Enterobacterales</i>	França (<i>A. baumannii</i>), 2003	Ásia, Europa, EUA, América do Sul, Austrália e África

5	OXA-55	<i>Shewanella algae</i>	França, 2004	
6	OXA-48	<i>Shewanella spp</i> , <i>Enterobacterales</i>	Turquia (<i>K. pneumoniae</i>), 2001	Ásia, Europa, Austrália
7	OXA-50	<i>P. aeruginosa</i>	Índia, 2003	
8	OXA-60	<i>Ralstonia pickettii</i>	2004	
9	OXA-62	<i>Pandoraea pnomenusa</i>	Alemanha, 2004	

^aOxacillin-hydrolyzing carbapenemases

(Adaptado de (Evans e Amyes, 2014; Girlich, Naas e Nordmann, 2004^a, 2004b; Héritier, Poirel e Nordmann, 2004; Queenan e Bush, 2007; Rafei *et al.*, 2015; Schneider, Queenan e Bauernfeind, 2006; Walther-Rasmussen e Høiby, 2006; Yoon e Jeong, 2021))

5. EPIDEMIOLOGIA DE CARBAPENEMASES EM PORTUGAL

A disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases tem vindo a aumentar consideravelmente, levando a uma preocupação generalizada na tentativa de diminuir e combater os surtos bem como obter alternativas farmacológicas (Lopes *et al.*, 2020).

Em Portugal, a taxa de disseminação destas bactérias tem vindo a aumentar, tendo sido documentados casos esporádicos a pequenos surtos entre 2010 e 2013 passando a um aumento significativo até aos dias de hoje (Manageiro *et al.*, 2018).

As primeiras carbapenemases a serem encontradas em Portugal correspondem às MBLs. O primeiro isolado a ser identificado foi de VIM-2, em 1995, posteriormente descrito em *P. aeruginosa* em 2002 (Cardoso *et al.*, 2002). Tem sido encontrada esporadicamente em isolados de doentes com fibrose quística e em diferentes hospitais sem relação clonal (Cardoso, Alves e Leitão, 2008). Em 2004 foram reportados casos desta enzima tanto em *Klebsiella oxycota* como em *Morganella morgannii* (Conceição *et al.*, 2005; da Silva e Duarte, 2011). A IMP-5 foi identificada pela primeira vez em 1998, em isolados de *A. baumannii* e posteriormente em *P. aeruginosa* e é considerada endémica (Brizio *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2002). A identificação da carbapenemases IMP-8 ocorreu, pela primeira vez em 2005, em *P. mendocina*, num sanitário hospitalar, o que representa um risco acrescido para doentes imunodeprimidos (Santos *et al.*, 2010).

Apenas têm sido reportados casos esporádicos de carbapenemases da classe B, ao passo que nas classes A e D, a sua prevalência é acentuada, principalmente de KPCs e OXA-48,

respetivamente (Gorgulho *et al.*, 2020; Kopotsa, Osei Sekyere e Mbelle, 2019; Mendes *et al.*, 2022).

No que concerne as carbapenemases da classe A, o primeiro caso reportado corresponde à KPC-3 e foi identificada num isolado de *K. pneumoniae* em 2009, no Centro Hospitalar de Lisboa. O primeiro clínico isolado de KPC-2 em Portugal foi identificado em 2019 em isolados de *K. pneumoniae* (Lopes *et al.*, 2020). Anteriormente, foi identificado em *E. coli* em amostras de água recolhidas de um rio em Santo Tirso em 2010 (Poirel *et al.*, 2012).

Relativamente às carbapenemases da classe D, a primeira identificada foi a OXA-40, em isolados de *A. baumannii* e *Acinetobacter haemolyticus* (Quinteira *et al.*, 2007). Também foram descritas mais variantes desta classe de carbapenemases como OXA-23 e OXA-58 em *A. baumannii* em diferentes hospitais entre 2006-2008 e 2005, respetivamente (da Silva e Duarte, 2011). Quanto à OXA-48, uma das enzimas mais predominantes atualmente em Portugal, esta foi identificada pela primeira vez em 2013 em isolados de *Enterobacter cloacae* e *E. coli*, num Hospital de Lisboa (Manageiro *et al.*, 2014).

Nos últimos 5 anos têm sido reportados vários casos de presença de bactérias multi-resistentes contendo carbapenemases na prática clínica, ambiente e animais com a predominância das KPC-2, KPC-3 e OXA-48 (Aires-De-Sousa *et al.*, 2019; Gorgulho *et al.*, 2020; Grundmann *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2020; Perdigão *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022).

A presença concomitante destas enzimas tanto em humanos como no ambiente e em animais evidencia a importância na tomada de medidas de forma unificadora (Lima, Domingues e da Silva, 2020; Zhang *et al.*, 2019). Além disso, também é necessário um maior controlo na escolha e utilização de ATBs, na regulamentação das medidas de controlo e prevenção destas infeções (Garcia, Osburn e Cullor, 2019). Neste sentido, e em articulação com várias Organizações Mundiais dos diversos setores, foi criada uma iniciativa denominada de “One Health”.

5.1. Monitorização e progressão da resistência a antibióticos

Os dados mais recentes que concernem à resistência antimicrobianos em Portugal publicados pela OMS constam do relatório de 2020, emitido no ano de 2022. Neste é reportado que a *K. pneumoniae* apresenta uma resistência aos carbapenemos de superior aos anos anteriores. Nos casos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* as percentagens reportadas são inferiores aos anos anteriores, como visível na figura 6 (ECDC e WHO, 2022). No caso de *E. coli*, o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) indica uma resistência aos carbapenemos de cerca de 0,2% (ECDC, 2022).

Num programa nacional desenvolvido em 2013, o Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA), estão reportados dados epidemiológicos relativos às taxas anuais de consumo de ATBs e de resistência aos antimicrobianos (DGS, 2021).

O decréscimo de resistência de *Acinetobacter spp.* aos carbapenemos é bastante significativo, tendo havido uma redução de 70% para 15% entre 2013 e 2020. No caso da *K. pneumoniae* ocorreu um aumento de 2% para 11,6% entre 2012 e 2020. Estes dados são visíveis na Figura 6.

No mesmo intervalo de estudo *Acinetobacter spp.* e *P. aeruginosa* evidenciam uma redução na resistência relativamente ao resto da Europa, sendo de 15% versus 38% e 11% e 12%, respetivamente (DGS, 2021).

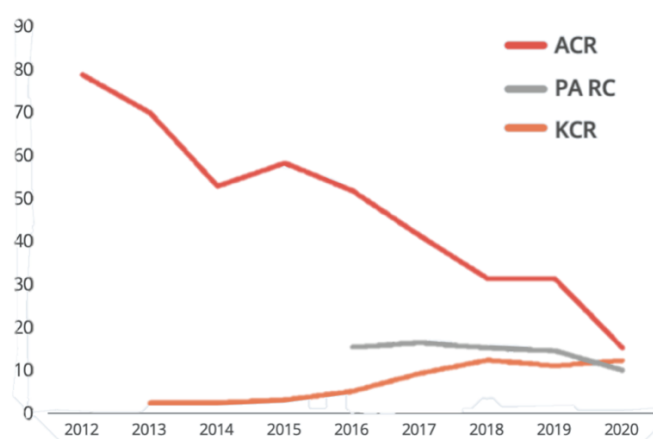


Figura 17 – Taxa de resistência aos carbapenemos por *Acinetobacter spp.* (ACR), *P. aeruginosa* (PA RC) e *K. pneumoniae* (KCR)

5.2. Monitorização e progressão do consumo de antibióticos

O consumo abusivo e incorreto de ATBs é um dos principais contribuidores para o aumento de resistências. Por este motivo, a sua monitorização é de extrema relevância, permitindo uma ação mais focada no seu controlo (Laxminarayan *et al.*, 2013).

No relatório epidemiológico anual referente ao consumo de fármacos antimicrobianos, relativo a 2020, encontram-se evidenciadas taxas de consumo de ATBs dispensados em ambulatório bem como consumidos pela comunidade. Os dados, expressos em doses diárias definidas (DDD) por 1000 habitantes por dia, evidenciam uma diminuição de 3,3% no consumo de ATBs entre 2011 e 2020 (ECDC, 2021). Os dados reportados relativos ao primeiro semestre de 2021 demonstram uma diminuição de 1,9% quando comparados ao mesmo período do ano anterior (DGS e PPCIRA, 2019).

No caso da utilização de carbapenemos no setor hospitalar, o PPCIRA reportou uma diminuição de 25% entre 2015 e 2019. No entanto, entre 2019 e 2020 a taxa de consumo de carbapenemos aumentou em 4,8% relativamente ao ano anterior (DGS e PPCIRA, 2019).

5.3. “One Health”

Esta iniciativa foi desenvolvida por entidades como a OMS, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) (DGS e PPCIRA, 2019). Pretendem atingir os melhores resultados para a saúde de todos, desde humanos e animais até às plantas, tendo sempre em consideração as interações entre eles (McEwen e Collignon, 2018).

Vários países têm adotados esta abordagem, incluindo Portugal. Esta adesão permite uma maior, mais rápida e fidedigna recolha de dados, o que possibilita uma melhor adaptação das medidas que têm vindo a ser desenvolvidas (WOAH, 2022).

A Direção Geral de Saúde (DGS) iniciou em 2019 um novo plano de combate à resistência aos antimicrobianos, que se prolongará até 2023, com objetivos globais e estratégias propostas bem como metas a serem atingidas até ao término deste plano. Neste plano foram estabelecidos 6 objetivos principais que passam pela melhoria no conhecimento sobre as resistências, otimização da utilização de ATBs, melhorias na vigilância epidemiológica, monitorização ambiental e investigação (DGS e PPCIRA, 2019). Outro grande objetivo passa pelo compromisso associado às medidas económicas e investimentos sustentáveis para técnicas de diagnóstico, tratamento das infeções e desenvolvimento de novos fármacos (McEwen e Collignon, 2018).

Relativamente aos carbapenemos, alguns, como o meropenemo e o doripenemo, já não passíveis de utilização na medicina veterinária e também não devem ser utilizados em gado para consumo humano.

Na vertente ambiental e animal, pretende-se a criação de melhores programas nutricionais, como condições nos estaleiros, com redução da densidade de gado, assim como estabelecimento de rotações nas culturas são medidas a ser aplicadas também de forma a reduzir a resistência a ATBs (Jechalke *et al.*, 2014).

6. DISCUSSÃO

A resistência aos ATBs é um problema emergente, maioritariamente proporcionado pela prática clínica, onde as infeções bacterianas provocadas por patógenos resistentes se tornam cada vez mais difíceis de tratar. O aumento dos custos do tratamento e das taxas de

mortalidade associadas a estas infecções constituem os principais fatores para este problema de saúde pública (Teixeira *et al.*, 2020).

Na comunidade também existem vários fatores que contribuem para esta propagação da resistência, através de géneros alimentícios, quer por comércio internacional, onde bactérias possivelmente endémicas se propagam para diferentes países, como na sua preparação (Bengtsson-Palme, Kristiansson e Larsson, 2018). As águas residuais são reservatórios de bactérias ambientais e, mesmo tratadas, contêm genes resistentes aos ATBs, fazendo com que estes interajam, tornando-se reservatórios para evolução e disseminação de patógenos resistentes (Cacace *et al.*, 2019). Estas águas são muitas vezes na agricultura, transmitindo as bactérias para as frutas e legumes que podem originar infeções limitantes, mas com risco acrescido em crianças e doentes imunodeprimidos, levando a complicações (Adegoke *et al.*, 2018).

Independentemente destes fatores, o consumo de ATBs permanece como principal interveniente, muitas vezes indevidamente e em diversas áreas como agricultura e aquicultura. Além da sua utilização na medicina veterinária, também são recorridos para a promoção do crescimento, e de forma mais acelerada, assim como de prevenção de doenças (Laxminarayan *et al.*, 2013).

Deste modo, ocorre a necessidade da adoção da perspetiva “One Health” e pelo maior número possível de países, permitindo uma recolha de dados mais completa. Com isto, poderão ser promovidas melhorias na saúde humana e animal, maior e mais eficaz controlo das infeções bacterianas e da transmissão da resistência a elas associadas. Algumas destas medidas têm apresentado resultados positivos (CDC, 2022).

O PPCIRA apresentava como um dos seus objetivos primários a redução do consumo de ATBs que, de acordo com os resultados mais recentes até à data, se têm demonstrado. Esta diminuição, além das medidas impostas, pode ter tido a influência da pandemia do COVID-19, que teve o seu início em 2020, tanto em ambulatório como em ambiente hospitalar (DGS e PPCIRA, 2019). O aumento da utilização de carbapenemos poderá ter sido afetado pela elevada incidência de superinfeção bacteriana em doentes com COVID-19 grave ou crítico (DGS e PPCIRA, 2019).

No caso das resistências antibacterianas, é evidenciada uma redução considerável de resistência de *Acinetobacter spp.* aos carbapenemos ao passo que para *K. pneumoniae* estes valores têm marcadamente aumentado (DGS e PPCIRA, 2019). Neste caso prevê-se uma revisão da Norma de Vigilância Epidemiológica de Resistência a Antimicrobianos. Além disso, *K. pneumoniae* necessita de especial atenção de modo a tomar medidas na tentativa de evitar o aumento da taxa de resistência aos carbapenemos. Estas medidas podem passar pelo melhor

controle e limpeza dos equipamentos hospitalares, métodos de identificação das estirpes bacterianas produtoras de carbapenemases e alternativas de tratamento (Bassetti *et al.*, 2018).

Algumas destas estratégias já têm sido aplicadas, mas nem sempre se revelam as mais eficazes, o que evidencia a necessidade de constante monitorização da sua eficácia bem como de todas as variáveis que as possam afetar. Deste modo, devem estar inseridas novas medidas corretivas e, acima de tudo, preventivas, de modo a conseguir uma redução das taxas de resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGOKE, Anthony A. *et al.* - Epidemiological evidence and health risks associated with agricultural reuse of partially treated and untreated wastewater: A review. *Frontiers in Public Health*. 6:DEC (2018). doi: 10.3389/fpubh.2018.00337.
- AIRES-DE-SOUSA, Marta *et al.* - Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*. 25:9 (2019). doi: 10.3201/eid2509.190656.
- AMBLER, R. P. - The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 289:1036 (1980). doi: 10.1098/rstb.1980.0049.
- AMBLER, R. P. *et al.* - A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical Journal*. 276:1 (1991). doi: 10.1042/bj2760269.
- AURILIO, Caterina *et al.* - Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*. 11:3 (2022). doi: 10.3390/antibiotics11030421.
- BARSY, Marie DE *et al.* - Detection and characterization of VIM-52, a new variant of VIM-1 from a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 65:11 (2021). doi: 10.1128/AAC.02660-20.
- BASSETTI, M. *et al.* - Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 24:2 (2018) 133–144. doi: 10.1016/j.cmi.2017.08.030.
- BEAUDUY, Camille E.; WINSTON, Lisa G. - Beta-Lactam & Other Cell Wall- & Membrane Active Antibiotics. *Em Basic & Clinical Pharmacology*. 14th. ed.: McGraw Hill, 2017. ISBN 9781259009327. p. 795–814.
- BENGTSSON-PALME, Johan; KRISTIANSSON, Erik; LARSSON, D. G. Joakim - Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 42:1 (2018). doi: 10.1093/femsre/fux053.
- BREIJYEH, Zeinab; JUBEH, Buthaina; KARAMAN, Rafik - Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*. 25:6 (2020). doi: 10.3390/molecules25061340.
- BREILH, Dominique *et al.* - Carbapenems. *Journal of Chemotherapy*. 25:1 (2013). doi: 10.1179/1973947812Y.0000000032.
- BRÍZIO, Ana *et al.* - High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class I integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.

- International Journal of Antimicrobial Agents. 27:1 (2006). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.08.023.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. - A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39:6 (1995). doi: 10.1128/AAC.39.6.1211.
- BUSH, Karen - β -Lactam antibiotics: penicillins. Em *Antibiotic and chemotherapy*. 9th. ed.: Elsevier Limited, 2010. ISBN 978-0-7020-4064-1. p. 200–225.
- BUSH, Karen - Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1277:1 (2013). doi: 10.1111/nyas.12023.
- BUSH, Karen - Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62:10 (2018). doi: 10.1128/AAC.01076-18.
- CACACE, Damiano *et al.* - Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. *Water Research*. 162:2019). doi: 10.1016/j.watres.2019.06.039.
- CARDOSO, Olga *et al.* - Metallo- β -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microbial Drug Resistance*. 8:2 (2002). doi: 10.1089/107662902760190635.
- CARDOSO, Olga; ALVES, Ana Florinda; LEITÃO, Rui - Metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31:4 (2008). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.12.006.
- CAYÔ, Rodrigo *et al.* - *Serratia marcescens* harboring SME-4 in Brazil: A silent threat. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 87:4 (2017). doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.008.
- CDC - One Health basis, atual. 7 fev. 2022. [Consult. 5 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>.
- CHENG, Zishuo *et al.* - Carbapenem use is driving the evolution of imipenemase I variants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 65:4 (2021). doi: 10.1128/AAC.01714-20.
- COLLIGNON, Peter J.; MCEWEN, Scott A. - One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 4:1 (2019). doi: 10.3390/tropicalmed4010022.

CONCEIÇÃO, T. *et al.* - First isolation of blaVIM-2 in *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:1 (2005). doi: 10.1128/AAC.49.1.476.2005.

COSTA, Thaina M. DA *et al.* - Pbp4: A new perspective on staphylococcus aureus β -lactam resistance. *Microorganisms*. 6:3 (2018). doi: 10.3390/microorganisms6030057.

DGS - Infecções e Resistências aos Antimicrobianos: Relatório Anual do Programa Prioritário 2021. Direção-Geral de Saúde. (2021).

DGS; PPCIRA - Plano Nacional de Combate à Resistência aos Antimicrobianos 2019-2023. Direção Geral de Saúde. 53:9 (2019).

DODDS, David R. - Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochemical Pharmacology*. 134:2017). doi: 10.1016/j.bcp.2016.12.005.

ECDC - Surveillance Atlas of Infectious Diseases, atual. 2022. [Consult. 5 jun. 2022]. Disponível em: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>.

ECDC; WHO - Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data. 2020 data. 2022) 98–99.

EGOROV, A. M.; ULYASHOVA, M. M.; RUBTSOVA, M. Yu - Inhibitors of β -Lactamases. *New Life of β -Lactam Antibiotics. Biochemistry (Moscow)*. 85:11 (2020). doi: 10.1134/S0006297920110024.

EICHENBERGER, Emily M.; THADEN, Joshua T. - Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics*. 8:2 (2019). doi: 10.3390/antibiotics8020037.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2020. Ecdc. November (2021) 1–24.

EVANS, Benjamin A.; AMYES, Sebastian G. B. - OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 27:2 (2014). doi: 10.1128/CMR.00117-13.

FINCH, Roger G. *et al.* - Antibiotic and chemotherapy. ISBN 978-0-7020-4064-1.

FISHER, Jed F.; MOBASHERY, Shahriar - Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Science*. 29:3 (2020). doi: 10.1002/pro.3737.

GARCIA, Sara N.; OSBURN, Bennie I.; CULLOR, James S. - A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*. 7:2019). doi: 10.1016/j.onehlt.2019.100086.

GHAI, Ishan; GHAI, Shashank - Understanding antibiotic resistance via outer membrane permeability. *Infection and Drug Resistance*. 11:2018). doi: 10.2147/IDR.S156995.

GIRLICH, Delphine; NAAS, Thierry; NORDMANN, Patrice - OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:11 (2004). doi: 10.1128/AAC.48.11.4217-4225.2004.

GIRLICH, Delphine; NAAS, Thierry; NORDMANN, Patrice - Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:6 (2004). doi: 10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004.

GORGULHO, Ana *et al.* - Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in a portuguese hospital – a five-year retrospective study. *GERMS*. 10:2 (2020). doi: 10.18683/germs.2020.1190.

GRUNDMANN, Hajo *et al.* - Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *The Lancet Infectious Diseases*. 17:2 (2017). doi: 10.1016/S1473-3099(16)30257-2.

HANSEN, Glen T. - Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infectious Diseases and Therapy*. 10:1 (2021). doi: 10.1007/s40121-020-00395-2.

HÉRITIER, Claire; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice - Genetic and Biochemical Characterization of a Chromosome-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing Ambler Class D β -Lactamase from *Shewanella algae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48:5 (2004). doi: 10.1128/AAC.48.5.1670-1675.2004.

HRENOVIC, J.; GANJTO, M.; GOIC-BARISIC, I. - Carbapenem-resistant bacteria in a secondary wastewater treatment plant. *Water SA*. 43:2 (2017). doi: 10.4314/wsa.v43i2.02.

HUTCHINGS, Matt; TRUMAN, Andrew; WILKINSON, Barrie - Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 51:2019). doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.

IOVLEVA, Alina; DOI, Yohei - Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinics in Laboratory Medicine*. 37:2 (2017). doi: 10.1016/j.cll.2017.01.005.

JECHALKE, Sven *et al.* - Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*. 22:9 (2014). doi: 10.1016/j.tim.2014.05.005.

KOPOTSA, Katlego; OSEI SEKYERE, John; MBELLE, Nontombi Marylucy - Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1457:1 (2019). doi: 10.1111/nyas.14223.

LAXMINARAYAN, Ramanan *et al.* - Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 13:12 (2013). doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.

LIMA, Lidia Moreira *et al.* - β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective

LIMA, Tiago; DOMINGUES, Sara; SILVA, Gabriela Jorge Da - Manure as a potential hotspot for antibiotic resistance dissemination by horizontal gene transfer events. *Veterinary Sciences*. 7:3 (2020). doi: 10.3390/VETSCI7030110.

LOGAN, Latania K.; WEINSTEIN, Robert A. - The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*. 215:2017). doi: 10.1093/infdis/jiw282.

LOPES, Elizeth *et al.* - Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in northern Portugal: Predominance of KPC-2 and OXA-48. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 22:2020). doi: 10.1016/j.jgar.2020.04.007.

LUCA, Maria Chiara DI *et al.* - Identification of a novel IMI carbapenemase variant (IMI-9) in *Enterobacter cloacae* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 48:6 (2016). doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.004.

LUPOLI, Tania *et al.* - Pharmacology of bacterial and mycobacterial infections: Cell wall synthesis. *Em Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. 3rd. ed. [S.I.] : Wolters Kluwer (UK) Ltd., 2012. ISBN 9781469821832. p. 1280–1314.

MACHEBOEUF, Pauline *et al.* - Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiology Reviews*. 30:5 (2006). doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x.

MANAGEIRO, Vera *et al.* - First description of oxa-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58:12 (2014). doi: 10.1128/AAC.02961-14.

MANAGEIRO, Vera *et al.* - Molecular epidemiology and risk factors of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates in Portuguese hospitals: Results From European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE). *Frontiers in Microbiology*. 9:NOV (2018). doi: 10.3389/fmicb.2018.02834.

- MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. - Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*. 6:2 (2018). doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017.
- MENDES, Gabriel *et al.* - First Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 in a Portuguese Hospital Centre during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms*. 10:2 (2022). doi: 10.3390/microorganisms10020251.
- MORAR, Mariya; WRIGHT, Gerard D. - The genomic enzymology of antibiotic resistance. *Annual Review of Genetics*. 44:2010). doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163517.
- NAAS, Thierry *et al.* - Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 32:1 (2017). doi: 10.1080/14756366.2017.1344235.
- NICOLAU, David P. - Carbapenems: A potent class of antibiotics. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 9:1 (2008). doi: 10.1517/14656566.9.1.23.
- NIKAIDO, Hiroshi - Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67:4 (2003). doi: 10.1128/mmbr.67.4.593-656.2003.
- NORDMANN, Patrice; DORTET, Laurent; POIREL, Laurent - Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*. 18:5 (2012). doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.
- ONE HEALTH COMMISSION - What is One Health? atual. 2022. [Consult. 19 jul. 2022]. Disponível em: https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/
- OPAL, Steven M.; POP-VICAS, Aurora - Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria. Em Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th. ed.v. 1. p. 279–296.
- PALZKILL, Timothy - Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1277:1 (2013). doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.
- PANDEY, Neelanjana; CASCELLA, Marco - Beta Lactam Antibiotics. Em StatPearls Treasure Island ed. [Consult. 17 mai. 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>. p. 1–13.
- PAPP-WALLACE, Krisztina M. *et al.* - Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55:11 (2011). doi: 10.1128/AAC.00296-11.

PERDIGÃO, João *et al.* - Genomic epidemiology of carbapenemase producing klebsiella pneumoniae strains at a northern portuguese hospital enables the detection of a misidentified klebsiella variicola kpc-3 producing strain. *Microorganisms*. 8:12 (2020). doi: 10.3390/microorganisms8121986.

PETERSON, Elizabeth; KAUR, Parjit - Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 9:NOV (2018). doi: 10.3389/fmicb.2018.02928.

PFEIFER, Yvonne; CULLIK, Angela; WITTE, Wolfgang - Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 300:6 (2010). doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.005.

POIREL, Laurent *et al.* - Environmental KPC-producing Escherichia coli isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56:3 (2012). doi: 10.1128/AAC.05850-11.

PONGCHAIKUL, Pisut; MONGKOLSUK, Paninee - Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo- β -Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia. *Antibiotics*. 11:2 (2022). doi: 10.3390/antibiotics11020236.

QUEENAN, Anne Marie; BUSH, Karen - Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 20:3 (2007). doi: 10.1128/CMR.00001-07.

QUINTEIRA, Sandra *et al.* - Molecular epidemiology of imipenem-resistant Acinetobacter haemolyticus and Acinetobacter baumannii isolates carrying plasmid-mediated OXA-40 from a Portuguese hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51:9 (2007). doi: 10.1128/AAC.00267-07.

RAFEI, Rayane *et al.* - Molecular epidemiology of Acinetobacter baumannii in different hospitals in Tripoli, Lebanon using bla OXA-51-like sequence based typing. *BMC Microbiology*. 15:1 (2015). doi: 10.1186/s12866-015-0441-5.

SANTOS, Cátia *et al.* - First description of blaIMP-8 in a Pseudomonas mendocina isolated at the Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Portugal. *Research in Microbiology*. 161:4 (2010). doi: 10.1016/j.resmic.2010.03.004.

SCHNEIDER, Ines; QUEENAN, Anne Marie; BAUERNFEIND, Adolf - Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from Pandoraea pnomenusa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50:4 (2006). doi: 10.1128/AAC.50.4.1330-1335.2006.

SILHAVY, Thomas J.; KAHNE, Daniel; WALKER, Suzanne - The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2:5 (2010). doi: 10.1101/cshperspect.a000414.

SILVA, Gabriela J. *et al.* - Molecular characterization of bla IMP-5 , a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an Acinetobacter baumannii nosocomial isolate in Portugal . FEMS Microbiology Letters. 215:1 (2002). doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11366.x.

SILVA, Gabriela J. DA; DUARTE, Aida - Carbapenemases em bactérias de Gram-negativo: o novo desafio terapêutico. RPD. 7:3 (2011) 124–130.

SILVA, Joana Moreira Da *et al.* - Companion Animals - An Overlooked and Misdiagnosed Reservoir of Carbapenem Resistance. 2022). doi: 10.3390/antibiotics11040533.

SPAGNOLO, Fabrizio; TRUJILLO, Monica; DENNEHY, John J. - Why Do Antibiotics Exist? mBio. 12:6 (2021). doi: 10.1128/mBio.01966-21.

SU, Hai Nan; ZHANG, Yu Zhong - Lifestyle of bacteria in deep sea. Environmental Microbiology Reports. 13:1 (2021). doi: 10.1111/1758-2229.12891.

TEIXEIRA, Pedro *et al.* - Occurrence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a Portuguese river: blaNDM, blaKPC and blaGES among the detected genes. Environmental Pollution. 260:2020). doi: 10.1016/j.envpol.2020.113913.

TOOKE, Catherine L. *et al.* - β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century

TULANE UNIVERSITY - Beta-lactam Pharmacology, atual. 2015. [Consult. 14 mai. 2022]. Disponível em: https://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/betalactam_pharm.

WAGLECHNER, Nicholas; WRIGHT, Gerard D. - Antibiotic resistance: It's bad, but why isn't it worse? BMC Biology. 15:1 (2017). doi: 10.1186/s12915-017-0423-1.

WALSH, Timothy R. *et al.* - Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? Clinical Microbiology Reviews. 18:2 (2005). doi: 10.1128/CMR.18.2.306-325.2005.

WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels - OXA-type carbapenemases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 57:3 (2006). doi: 10.1093/jac/dki482.

WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels - Class A carbapenemases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 60:3 (2007). doi: 10.1093/jac/dkm226.

WENCEWICZ, Timothy A. - Crossroads of Antibiotic Resistance and Biosynthesis. Journal of Molecular Biology. 431:18 (2019). doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.033.

WENDEL, Andreas F.; MACKENZIE, Colin R. - Characterization of a novel Metallo- β -lactamase variant, GIM-2, from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59:3 (2015). doi: 10.1128/AAC.05062-14.

WHO - Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities. Who. 2017) 1–74.

WHOB - WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, atual. 27 fev. 2017. [Consult. 12 jun. 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

WILSON, Hayley; TÖRÖK, M. Estée - Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*. 4:7 (2018). doi: 10.1099/mgen.0.000197.

WOAH - One Health, atual. 2022. [Consult. 21 jul. 2022]. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/#ui-id-2>.

WOZNIAK, Aniela *et al.* - First isolate of SPM-I- producing *Pseudomonas aeruginosa* (São Paulo metallo- β -lactamase) in a Chilean patient. *Revista Chilena de Infectología*. 38:5 (2021) 724–726. doi: 10.4067/s0716-10182021000500724.

WU, Wenjing *et al.* - NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clinical Microbiology Reviews*. 32:2 (2019). doi: 10.1128/CMR.00115-18.

YOON, Eun Jeong; JEONG, Seok Hoon - Class D β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 76:4 (2021). doi: 10.1093/jac/dkaa513.

ZHANG, Yanpeng *et al.* - Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem under consecutive imipenem-selected stress in *acinetobacter baumannii*. *Infection and Drug Resistance*. 11:2018). doi: 10.2147/IDR.S151423.

ZHANG, Yu Jing *et al.* - Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes. *Environment International*. 130:2019). doi: 10.1016/j.envint.2019.104912.