



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sónia da Silva Lopes

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da suscetibilidade *in vitro* à combinação Cefotaxima-Avibactam em bactérias multirresistentes isoladas no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Teresa Guimarães 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.

Julho de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sónia da Silva Lopes

**Relatório de Estágio e Monografia intitulada
“Avaliação da suscetibilidade *in vitro* à
combinação Ceftazidima-Avibactam em
bactérias multirresistentes isoladas no Centro
Hospitalar da Universidade de Coimbra”**

Referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Teresa Guimarães e da Professora Doutora Gabriela Jorge da Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Coimbra, julho de 2019

Eu, Sónia da Silva Lopes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014227885, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da suscetibilidade *in vitro* à combinação Ceftazidima-Avibactam em bactérias multirresistentes isoladas no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de julho de 2019

Sónia da Silva Lopes

(Sónia da Silva Lopes)

Agradecimentos

Aos meus pais, Alcindo e Helena, que fazem sempre os possíveis para me proporcionar as melhores condições para que possa atingir os meus objetivos, mesmo que longe de casa; obrigado por me ouvirem, aconselhar e apoiar nas minhas decisões.

Ao meu irmão Nelson, pelos conselhos sábios de irmão mais velho e por, mesmo estando longe, conseguir estar presente em todos os momentos mais importantes.

Ao meu namorado Filipe, por ser uma pessoa excepcional que está sempre a meu lado.

Um agradecimento especial à Tânia Baptista, à Tânia Martins e à Adriana Silva. Às minhas “Taninhas” e à minha “bochechinhas”, obrigado pela amizade e por poder contar convosco para tudo.

Aos restantes amigos e colegas, pelos bons momentos em Coimbra e nas idas a casa.

À Professora Doutora Gabriela Silva pela oportunidade de realizar o projeto e a monografia com ela. Obrigado pelos ensinamentos, pela compreensão e pela orientação e revisão deste trabalho.

À Mestre Teresa Reis, do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra por proporcionar as condições de realização do projeto.

À Cláudia Cantadeiro, pela amizade durante o período de investigação e pelos ensinamentos que me permitiram realizar o trabalho.

À Farmácia Cardoso e a toda a sua equipa, especialmente à Dra. Dorinda Ascensão e à Dra. Teresa Guimarães pela possibilidade de realizar o estágio e pelo acompanhamento.

A Coimbra!

“O sucesso não vale nada se não temos alguém para partilhá-lo.”

Anthony Robbins

Resumo

O ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra prima-se pela ampla formação e preparação dos seus alunos enquanto profissionais de saúde. Com isto, o Estágio Curricular que decorre no último semestre do 5º ano tem por objetivo aproximar e integrar os alunos naquele que será o seu futuro na vida profissional, permitindo aplicar no dia-a-dia os conhecimentos adquiridos ao longo dos vários anos de estudos com aplicação em várias áreas de atuação farmacêutica.

Assim, este documento inclui um Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária realizado na Farmácia Cardoso sob orientação da Dra. Teresa Guimarães. O presente relatório trata-se de uma análise SWOT, tanto da farmácia como do estágio, que decorreu entre 07 de janeiro de 2019 e terminou no dia 07 de junho do mesmo ano.

O presente documento inclui ainda uma monografia intitulada “Avaliação da suscetibilidade *in vitro* à combinação Ceftazidima-Avibactam em bactérias multirresistentes isoladas no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra”. Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da suscetibilidade à combinação Ceftazidima-Avibactam em bactérias multirresistentes produtoras de carbapenemases, a nível experimental, isoladas em doentes do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra entre novembro de 2016 e agosto de 2017. Os resultados permitem concluir que a combinação ceftazidima-avibactam apresenta uma elevada capacidade de inibir bactérias produtoras de β -lactamases de largo espetro e carbapenemases do tipo KPC, amplamente disseminadas. À data e do meu conhecimento, este é o primeiro estudo que reporta dois isolados *Klebsiella oxytoca* resistentes à combinação ceftazidima-avibactam em Portugal. Contudo, o mecanismo de resistência não foi determinado.

Palavras-Chave: MICF; Farmácia Comunitária; *Klebsiella pneumoniae*; β -lactamases; Ceftazidima-Avibactam; Resistência a Ceftazidima-Avibactam; *Klebsiella oxytoca*.

Abstract

The cycle of studies of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences at the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra excels at the extensive training and preparation of its students as health professionals. Considering this, the Curricular Internship that takes place in the last semester of the 5th year aims to approach and integrate the students in what will be the future of their professional life, allowing to apply in a daily basis the knowledge acquired throughout the several years of studies with application in several areas of pharmaceutical activity.

Thus, this document includes a Report of Internship in Community Pharmacy held at the Cardoso Pharmacy under the guidance of Dra. Teresa Guimarães. This report is a SWOT analysis of both the pharmacy and the internship, which took place between January 7, 2019 and ended on June 7 of the same year.

This document also includes a monograph titled "Evaluation of *in vitro* susceptibility to the combination Ceftazidime-Avibactam in multiresistant bacteria isolated in the Hospital Center of the University of Coimbra". The main objective of this study was to study the susceptibility to the combination Ceftazidime-Avibactam in multiresistant bacteria producing carbapenemases, at an experimental level, isolated in patients from the Hospital Center of the University of Coimbra between November 2016 and August 2017. The results allow us to conclude that a combination of ceftazidime-avibactam has a high ability to inhibit widely disseminated extended spectrum beta-lactamases producing bacteria and KPC-type carbapenemases. To this date and to my knowledge, this is the first study reporting two *Klebsiella oxytoca* isolates resistant to the combination ceftazidime-avibactam in Portugal. However, the resistance mechanism has not been determined.

Keywords: MICF; Community pharmacy; *Klebsiella pneumoniae*; β -lactamases; Ceftazidime-Avibactam; Resistance to Ceftazidime-Avibactam; *Klebsiella oxytoca*.

Lista de abreviaturas

AMC – Amoxicilina e Ácido Clavulânico

AmpC – *Ampicillinase C*

AMR – *Antimicrobial resistance*

AVI – Avibactam

BL – β -lactâmico

BLI – *β -lactamase inhibitors*

CAZ – Ceftazidima

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CEF-AVI – Ceftarolina-Avibactam

CHUC – Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra

cIAI – *Complicated Intra-abdominal Infections*

CIP – Ciprofloxacina

CL – Colistina

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CPE – *Carbapenemase-producing Enterobacterias*

CRE – *Carbapenem-resistant Enterobacterias*

CTX – Cefotaxima

CTX-M – Cefotaximase

cUTI – *Complicated Urinary Tract Infections*

CZA – Ceftazidima-avibactam

DBO – *Diazabicyclooctanes*

EARS-Net – *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

EMA – *European Medicines Agency*

ESBL – *Extended Spectrum Beta-Lactamases*

ETP – Ertapenemo

EUA – Estados Unidos da América

EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA – *Food and Drug Administration*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GEN – Gentamicina

HAP – *Hospital Acquired Pneumonia*

IPM – Imipenemo
IV – Intravenoso
KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
MBL – Metalo- β -lactamases
MDR – *Multidrug-resistant*
MIC – *Minimum inhibitory concentrations*
MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
NDM – Nova Deli Metallo-beta-lactamase
OXA – *Oxacillinase*
PBP – *Penicillin-binding proteins*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PDR – *Pan-drug-resistant*
PUDI – Pessoas que Utilizam Drogas Injetáveis
SHV – *Sulphydryl Variable*
SXT – trimetoprim/sulfametoxazol
TEM – *Timoniera*
TGC – Tigeciclina
UE – União Europeia
VAP – *Ventilator Associated Pneumonia*
VIM – *Verona Integron Metallo Beta-lactamase*
XDR – *Extensively drug-resistant*

Figuras

Figura 1 – Exterior da Farmácia Cardoso.....	2
Figura 2 – Interior da Farmácia Cardoso.....	2
Figura 3 – Logotipo da Farmácia Cardoso.....	2
Figura 4 – Diferentes classes de agentes antimicrobianos e seus mecanismos.....	17
Figura 5 – Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos. (a) alteração do efluxo de agentes antimicrobianos; (b) modificação dos agentes antimicrobianos; (c) modificação dos alvos dos agentes antimicrobianos.....	19
Figura 6 – Visão geral de novos compostos.....	24
Figura 7 – Estrutura molecular de avibactam e ceftazidima.....	25
Figura 8 – Amostras biológicas dos isolados bacterianos, por ordem decrescente do número de amostras.....	35
Figura 9 – Diferentes enfermarias nas quais foram recolhidos os isolados bacterianos, por ordem decrescente do número de isolados colhidos em cada enfermaria.....	35
Figura 10 – Perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos dos 100 isolados de acordo com os resultados fornecidos pelo CHUC.....	36
Figura 11 – Perfil de suscetibilidade dos 100 isolados aos agentes antimicrobianos Ceftazidima (CAZ) vs Ceftazidima/Avibactam (CZA).....	37
Figura 12 – Diâmetro dos halos de inibição dos antibiogramas com ceftazidima, em milímetros (mm).....	37
Figura 13 – Diâmetro dos halos de inibição dos antibiogramas com a combinação ceftazidima-avibactam, em milímetros (mm).....	38
Figura 14 – Antibiogramas de isolados clínicos - <i>Klebsiella pneumoniae</i> . A) Isolado 5; B) Isolado 7; C) Isolado 6.....	39

Resumo.....	I
Abstract.....	II
Parte I - Relatório de Estágio	
I. Introdução	1
II. Farmácia Cardoso.....	2
III. Análise SWOT	3
3.1. Forças	3
3.1.1. A Equipa da Farmácia Cardoso.....	3
3.1.2. Localização e horário de funcionamento.....	3
3.1.3. Desenvolvimento de competências	4
3.1.4. Cartão Saúde e presença nas redes sociais	4
3.1.5. Serviços com impacto ambiental.....	5
3.1.6. Parcerias com entidades locais.....	6
3.1.7. Rastreiros e outras atividades.....	6
3.1.8. Formação	6
3.2. Fraquezas.....	7
3.2.1. Falta de plano de estágio e orientador definidos.....	7
3.2.2. Tamanho da farmácia.....	7
3.2.3. Preparação de manipulados.....	7
3.2.4. Acesso à farmácia – estacionamento.....	8
3.2.5. Prestação de serviços	8
3.3. Oportunidades.....	8
3.3.1. Plano curricular do MICF.....	8
3.3.2. Valor do Farmacêutico e educação para a saúde.....	9
Caso Clínico 1 – Exercício de escolha (benefício/risco).....	9
Caso Clínico 2 – Educação para a saúde.....	10
3.3.3. Dispositivos de segurança nos medicamentos de uso humano	10
3.4. Ameaças	10
3.4.1. Falta de medicamentos.....	10
3.4.2. Automedicação	11
Caso Clínico 3 – Referenciação para o médico	11

Caso Clínico 4 – Automedicação	11
3.4.3. Plano curricular do MICF	12
3.4.4. Dispositivos de segurança nos medicamentos de uso humano	12
3.4.5. Receitas Desmaterializadas	12
IV. Considerações Finais	14
Parte II - “Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> à combinação Ceftazidima-Avibactam em bactérias multirresistentes isoladas no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra”	
I. Introdução	15
1.1. Resistência Antimicrobiana – Uma Preocupação Global	15
1.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
1.2. Agentes Antimicrobianos	17
1.2.1. Mecanismos de Ação	17
1.2.2. Mecanismos de Resistência	18
1.3. β-lactamases	20
1.3.1. β-lactamases de largo espectro – ESBLs	21
1.3.2. Carbapenemases	21
1.4. Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos	22
II. Novos Agentes antimicrobianos e Associações	23
2.1. Ceftazidima-Avibactam	25
III. Resistências à Ceftazidima-Avibactam	29
IV. Objetivos	31
V. Material e Métodos	31
5.1. Isolados bacterianos	31
5.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana	32
5.3. Detecção molecular e identificação de β-Lactamases	32
VI. Resultados e Discussão	34
VII. Conclusão	43
Referências	44
Anexo I – Formações realizadas ao longo do estágio curricular	57
Anexo II – <i>Breakpoints</i> de inibição para Ceftazidima e Ceftazidima-Avibactam	58

PARTE I

Relatório de Estágio

I. Introdução

Em Portugal, existem farmacêuticos desde 1449. O papel do farmacêutico tem vindo a revelar-se determinante nas últimas duas décadas, com uma posição privilegiada do farmacêutico comunitário ao contribuir em áreas como a determinação de parâmetros, promoção de estilos de vida mais saudáveis... Para além dos serviços referidos, a área do medicamento é a atividade central do farmacêutico para a qual a sua formação académica o diferencia dos restantes profissionais de saúde (*Ordem dos Farmacêuticos, 2019*).

O Estágio Curricular é parte integrante do ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Tem por objetivo aproximar e integrar os alunos naquele que será o seu futuro na vida profissional, permitindo aplicar no dia-a-dia os conhecimentos adquiridos ao longo dos vários anos de estudos.

Apesar de ser possível realizar estágio em várias áreas de atuação farmacêutica, tais como distribuição farmacêutica, assuntos regulamentares e controlo de qualidade em indústrias farmacêuticas, farmácia hospitalar, entre outros, decidi apenas realizar o estágio obrigatório em farmácia comunitária por ser esta a área que me desperta mais interesse.

A escolha da farmácia prendeu-se com a proximidade à residência e na possibilidade de experimentar um ambiente de trabalho em cidade, visto já ter realizado um estágio de verão numa farmácia pouco movimentada no âmbito do programa de Estágios de Verão da Universidade de Coimbra. O estágio teve início no dia 07 de janeiro de 2019 e terminou no dia 07 de junho do mesmo ano, perfazendo 810 horas.

O presente relatório trata-se de uma análise SWOT, tanto da farmácia como do estágio, de forma integrada. São ainda apresentados casos práticos que demonstram a aplicação de conhecimento adquirido nas unidades curriculares do MICF.

II. Farmácia Cardoso

A Farmácia Cardoso, aderente ao programa Farmácias Portuguesas, situa-se na cidade de Póvoa de Varzim e é propriedade da diretora técnica, a Dra. Maria Dorinda Ascensão.

A equipa é composta exclusivamente por farmacêuticos, contabilizando-se 7 no total: a Dra. Bruna, a Dra. Cláudia, o Dr. David, a Dra. Dorinda, a Dra. Rosária, a Dra. Sílvia e a Dra. Teresa.

A farmácia está aberta de segunda a sexta-feira das 9h às 22h e ao sábado das 9h às 13h. A área contempla 4 balcões na sala de atendimento, 1 gabinete do utente, área de armazenamento e laboratório. As Figuras 1 e 2 mostram a área exterior e interior, respetivamente, da farmácia.

A Farmácia Cardoso diferencia-se pela sua missão “*Farmácia Cardoso, Sempre a Cuidar de Si...*” e pelo logotipo próprio, representado na Figura 3.



Figura 1^{*1} – Exterior da Farmácia Cardoso



Figura 2^{*2} – Interior da Farmácia Cardoso



Figura 3^{*3} – Logotipo da Farmácia Cardoso

*1 e 2 – Fonte: <http://www.farmacia-cardoso.com/> [Acedido a 08/06/2019]

*3 – Fonte: <https://www.facebook.com/farmaciacardosopvz/> [Acedido a 08/06/2019]

III. Análise SWOT

A análise SWOT é um método baseado na identificação das Forças (*Strengths*), Fraquezas (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) de uma organização. O objetivo é reforçar os pontos fortes internos e aproveitar as oportunidades externas de forma a alcançar os objetivos, e ao mesmo tempo, atenuar as fraquezas internas e prevenir as ameaças externas.

3.1. Forças

3.1.1. A Equipa da Farmácia Cardoso

“O farmacêutico é um profissional de saúde com grande proximidade à população, (...) uma média de 3 farmacêuticos por farmácia” (*Valor do Farmacêutico*, 2019). Tendo em conta este facto, a equipa da farmácia ser totalmente constituída por farmacêuticos transmite a “importância da intervenção farmacêutica na sociedade” (*Valor do Farmacêutico*, 2019) através do aconselhamento farmacoterapêutico que se traduz na confiança que as pessoas demonstram no atendimento que qualquer um dos colegas farmacêuticos providencia na farmácia.

De realçar também a comunicação entre a equipa, que permite que diferentes informações cheguem a todos os elementos de forma eficaz. O facto de a diretora técnica ser bastante presente na farmácia e realizar atendimentos, também é um ponto importante, na medida em que permite uma liderança partilhada na qual todos são importantes para a farmácia e todos têm um papel importante a desempenhar.

De referir ainda que se trata de uma equipa jovem, bem-disposta e bastante competente que transmitiu os seus conhecimentos e me fizeram sentir integrada durante todo o estágio.

3.1.2. Localização e horário de funcionamento

A Farmácia Cardoso privilegia da sua localização próxima de vários “locais chave” no âmbito da saúde, nomeadamente, o Centro Hospitalar da Póvoa de Varzim, o Centro de Saúde e clínicas dentárias. Fica também próxima das duas escolas secundárias e do Mercado Municipal da Póvoa de Varzim, tornando-se numa farmácia de fácil acesso a partir de vários pontos muito frequentados e de relevância na zona.

Na Póvoa de Varzim existem no total 10 farmácias, das quais a Farmácia Cardoso é a única com horário mais alargado, fechando apenas às 22h e junta-se a apenas mais quatro farmácias que não fecham na hora de almoço. Assim, o horário de funcionamento é sem dúvida uma vantagem, permitindo que as pessoas tenham acesso aos medicamentos e cuidados de saúde num horário compatível com o trabalho/ vida de cada um.

3.1.3. Desenvolvimento de competências

Todos os dias o farmacêutico tem de estabelecer uma relação farmacêutico-utente na qual a comunicação é fulcral. Cada pessoa, com a sua forma de ser, torna cada atendimento diferente e desafiante do ponto de vista técnico e científico. Desta forma, cada atendimento realizado ao longo do estágio permitiu o desenvolvimento das capacidades de comunicação e de gestão de conflitos para que pudesse servir as pessoas da melhor forma.

3.1.4. Cartão Saúde e presença nas redes sociais

Hoje em dia as pessoas são mais informadas e procuram serviços melhores e personalizados, pelo que boas estratégias de comunicação e de fidelização são essenciais para que se consiga chegar às pessoas e fidelizá-las.

Sendo a Farmácia Cardoso aderente ao programa Farmácias Portuguesas, os utentes que aqui se dirigem podem utilizar o Cartão Saúde e usufruir das suas vantagens. tais como: ter acesso a promoções exclusivas e trocar pontos (adquiridos na compra de produtos de saúde e bem-estar, medicamentos não sujeitos a receita médica e serviços farmacêuticos) por produtos ou por vales de dinheiro. No início do estágio, a Farmácia detinha um cartão de fidelidade de uso exclusivo na mesma. No entanto, a decisão de mudar para o Cartão Saúde mostrou-se bastante promissora, tendo em conta que houve uma grande adesão e as pessoas começaram a ter mais atenção e a usufruir das promoções que o cartão disponibilizava.

A farmácia dispõe de um *site* e de uma página no *Facebook*, onde são divulgadas as promoções existentes, e se comemoram dias temáticos. No entanto o público-alvo da farmácia não aderiu muito às redes sociais, pelo que não se notava uma mudança no estilo de compra dos utentes.

3.1.5. Serviços com impacto ambiental

Atualmente, levantam-se muitas questões a nível ambiental e, sendo as farmácias locais públicos prestadores de serviços é de máxima importância educarmos as pessoas para o impacto ambiental que os resíduos de medicamentos e demais excedentes causam ao ambiente pelo qual todos somos responsáveis.

A Farmácia Cardoso dispõe de três serviços que permitem sensibilizar e educar os seus utentes neste sentido, nomeadamente:

Valormed – trata-se de uma sociedade sem fins lucrativos com a responsabilidade de gerir os resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso (*VALORMED, 2019*); na farmácia são cedidos aos utentes ecopontos domésticos, designados ECOMED, que podem ser caixas de cartão ou sacos reutilizáveis (*VALORMED, 2019*) que quando cheios são entregues na farmácia para colocação no Valormed para posterior processamento; durante o estágio pude constatar uma grande adesão na entrega de medicamentos fora de prazo na farmácia, mas que ainda há uma quantidade significativa de pessoas que dizem que “não estão para ter o trabalho de separar e vir entregar” pelo que se trata de uma questão que ainda implica muito trabalho de sensibilização de forma a que um dia possamos obter melhores resultados;

Programa de Troca de Seringas – este programa foi implementado em 1993, tendo como principal objetivo prevenir infeções provocadas pelo VIH entre as Pessoas que Utilizam Drogas Injetáveis (PUDI), proporcionando a distribuição de material esterilizado e a recolha e destruição do material usado, tanto em farmácias como centros de saúde e postos móveis (*SPMS - Serviços Partilhados do Ministério da Saúde, 2019*). Segundo os últimos dados, "entre outubro de 1993 e Setembro de 2018, foram distribuídas 57.488.517 agulhas e seringas e 30.396.489 preservativos masculinos", verificando-se uma “significativa redução (...) nos últimos anos no número de novos casos de infeção por VIH diagnosticados entre as Pessoas que Utilizam Drogas Injectáveis, de 57,3% em 1998 para 1,8% em 2017” (*SNS - Serviço Nacional de Saúde, 2019*). Na farmácia Cardoso, as pessoas apareciam de forma muito esporádica para efetuar a troca;

Recolha de Radiografias – trata-se de uma “campanha anual de reciclagem de radiografias (...) com mais de 5 anos ou sem valor de diagnóstico” (*AMI - Assistência Médica Internacional, 2019*), que as pessoas deixam na farmácia. Na Farmácia Cardoso bastantes pessoas entregam as suas radiografias durante todo o ano.

3.1.6. Parcerias com entidades locais

A Farmácia Cardoso criou parcerias com algumas entidades locais, nomeadamente, com a Casa do Regaço, um centro de acolhimento de crianças gerido pela Cruz Vermelha Portuguesa da Póvoa de Varzim, e com a equipa de andebol do clube local. A farmácia patrocina estas instituições apoiando com um valor mensal definido de apoio à atividade dos mesmos.

3.1.7. Rastreios e outras atividades

A Farmácia Cardoso prima-se pela preocupação com a saúde e bem-estar dos seus utentes. Sempre que possível são realizados alguns rastreios com a colaboração de outros profissionais de saúde, como os enfermeiros. Durante o tempo de estágio realizaram-se vários rastreios, nomeadamente: um Rastreo de Osteoporose, o qual teve uma elevada afluência, não só por mulheres como também por homens; um Rastreo da Pele no qual era identificado o tipo de pele de cada pessoa e os produtos cosméticos mais adequados; um Rastreo de Doença Venosa Crónica; e um Rastreo de Colesterol enquadrado na celebração do mês do coração (maio).

Ao longo do estágio também se desenvolveram outras iniciativas temáticas tais como a afixação de um cartaz informativo no Dia Mundial do Cancro e a distribuição de uma flor às mulheres em forma de comemoração do Dia da Mulher.

3.1.8. Formação

“A formação é cada vez mais, um pilar fundamental de conhecimento para uma recomendação assertiva e personalizada que não se limita ao ato de venda.” - *GSK Consumer Healthcare*

Durante o estágio tive oportunidade de participar em algumas formações tanto na farmácia, por parte dos delegados de informação médica, como fora da farmácia, por parte de algumas marcas e laboratórios. Estas formações foram sem dúvida uma mais valia durante o estágio, na medida em que permitiram eliminar algumas lacunas que o plano de estudos do MICF apresenta. No Anexo I encontram-se resumidas as formações em que estive presente ao longo do estágio.

3.2. Fraquezas

3.2.1. Falta de plano de estágio e orientador definidos

Em relação ao estágio, apesar de ter havido uma boa integração no ambiente da equipa, a integração a nível laboral não foi tão fácil. A falta de um plano de estágio e de um orientador definidos foram sem dúvida marcantes, na medida em que nos primeiros dois meses do estágio passava grande parte do tempo no “*backoffice*”. Conforme o tempo que restava, seguia alguns atendimentos e eram explicados alguns fundamentos do aconselhamento. Durante este período foi também explicado o tratamento do receituário e devoluções. Passado esse tempo é que comecei a ter maior acompanhamento a nível de aconselhamento farmacoterapêutico e comecei a estar mais tempo em contacto com os utentes. No entanto, continuou a não haver um plano de estágio e um orientador definidos.

3.2.2. Tamanho da farmácia

A Farmácia Cardoso é bastante movimentada, com uma média de 300 pessoas por dia e o espaço é o ponto fraco mais notório. A sala de atendimento é relativamente pequena, e apesar de a farmácia dispor de 4 balcões de atendimento, normalmente apenas 3 estão ativos, sendo o quarto de suporte para obtenção de alguma informação necessária. Quando estão os 4 balcões em funcionamento, perde-se a devida privacidade que alguns atendimentos exigem, tanto para os utentes exporem a situação como para os farmacêuticos aconselharem de forma adequada. Apesar de conseguirem ter uma elevada diversidade de produtos, a capacidade de armazenamento é bastante baixa, pelo que na maioria das vezes é necessário encomendar a quantidade em falta.

3.2.3. Preparação de manipulados

Face ao ponto anterior, o laboratório que a farmácia dispõe também é pequeno. Durante o estágio, apenas se realizou o mesmo manipulado várias vezes. Fora este, os pedidos de manipulados que a farmácia recebe são encaminhados para a Farmácia Marques Ramalho que tem um laboratório e equipa especializada.

3.2.4. Acesso à farmácia – estacionamento

Embora a localização da farmácia seja muito boa, o acesso pode ser complicado. Situa-se numa rua de sentido único e com estacionamento pago. Os lugares estão sempre ocupados ao longo do dia pelo que as pessoas deixam os carros estacionados em segunda fila, causando alguns constrangimentos.

3.2.5. Prestação de serviços

Hoje em dia, as farmácias primam pela diferenciação dos serviços disponibilizados. Na Farmácia Cardoso, apesar de existir pessoal qualificado para a administração de injetáveis, não usufruí deste serviço, pelo que as pessoas têm que se deslocar ao centro de saúde, a um centro de enfermagem, ou até mesmo a outra farmácia que disponibilize este serviço. Da mesma forma que os rastreios são realizados no gabinete do utente disponível, outros serviços poderiam ser implementados, assim como consultas de podologia ou aconselhamento nutricional, trazendo mais valências à farmácia e um fator de diferenciação.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Plano curricular do MICF

O plano de estudos do MICF na Universidade de Coimbra é sem dúvida bastante vasto e abrange vários conhecimentos de forma a que todo os alunos se sintam preparados para a entrada no mercado nas diferentes áreas atuantes enquanto farmacêuticos.

No presente ano letivo, o plano de estudo sofreu algumas alterações que, do meu ponto de vista, beneficiam bastante os alunos, nomeadamente a separação das unidades curriculares de Intervenção Farmacêutica e de Fitoterapia. Assim, foi possível abordar mais temas, tais como, a ostomia, o que durante o estágio se tornou bastante útil. A Farmácia Cardoso tem alguns utentes que vivem com diferentes ostomias e os conhecimentos adquiridos permitiram que já conhecesse os diferentes produtos existentes no mercado e pudesse sentir-me mais à vontade nos atendimentos.

A maioria das farmácias utiliza o sistema informático Sifarma 2000®. Desta forma, a interação com o sistema na unidade curricular de Organização e Gestão Farmacêutica,

mais tarde complementada com a formação disponibilizada nas atividades da semana *Pharmacareer*, foi bastante útil. A realização do estágio na Farmácia Cardoso também me permitiu aplicar e aumentar os conhecimentos sobre este sistema informático.

Nas atividades do *Pharmacareer*, também foi possível participar num *workshop* de Gestão de Conflitos, que permitiu adquirir algumas bases de comunicação que tive oportunidade de aplicar durante o estágio.

3.3.2. Valor do Farmacêutico e educação para a saúde

O farmacêutico, enquanto especialista do medicamento, apresenta um papel importante em toda a conjuntura da área da saúde. Todos os dias, as pessoas que se dirigem à farmácia, procuram ajuda para resolução dos seus problemas de saúde, ora já por orientação médica, ora por reconhecerem o farmacêutico como um profissional de saúde de confiança e com conhecimentos técnico-científicos.

Segundo o Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos, é dever do farmacêutico promover a “utilização segura, eficaz e racional dos medicamentos”, assim como “dispensar ao doente o medicamento em cumprimento da prescrição médica ou exercer a escolha que os seus conhecimentos permitem e que melhor satisfaça as relações benefício/risco e benefício/custo” (*Ordem dos Farmacêuticos*, 2019).

De facto, durante o estágio, foi possível constatar a importância do farmacêutico na comunidade tanto na resolução de problemas como no aumento da literacia em saúde, aplicando os conhecimentos adquiridos aos longo do plano curricular do MICF.

Seguem-se alguns exemplos:

Caso Clínico 1 – Exercício de escolha (benefício/risco)

Um senhor, com cerca de 60 anos, foi à farmácia aviar uma receita, já no final da validade, com Circadin®. O senhor começou por dizer que não tinha levantado a receita mais cedo porque não queria tomar aquilo e preferia algo natural. Quando lhe perguntei qual era a situação, o senhor referiu que tem dificuldades em manter o sono, apresentando vários despertares noturnos. Assim, aconselhei o StilNoite® cuja composição contém melatonina e extratos de várias plantas, tais como: papoila da Califórnia, Melissa e passiflora.

Caso Clínico 2 – Educação para a saúde

Uma senhora, com cerca de 50 anos, dirigiu-se à farmácia e pediu algo que pudesse aplicar num hematoma que apresentava no maxilar inferior. Quando questionada sobre o que tinha acontecido, a senhora explicou que tinha sido submetida a uma extração dentária. Após a exposição da situação questionei se tomava alguma medicação ao que ela respondeu que tomava o Varfine® e não tinha referido nada ao médico dentista. Com isto, foi explicado à senhora que, durante o procedimento cirúrgico ocorreu uma hemorragia e o sangue não foi capaz de coagular de forma adequada, visto que o Varfine® se trata de um medicamento anticoagulante. Foi aconselhado à senhora que em situações idênticas fale sempre com o médico sobre a medicação que toma e para aplicar Thrombocid® pomada na zona do hematoma.

3.3.3. Dispositivos de segurança nos medicamentos de uso humano

A Diretiva 2001/83/CE prevê medidas para impedir a introdução de medicamentos falsificados na cadeia de abastecimento legal. Para isso, é exigida a colocação de dispositivos de segurança – um identificador único e um dispositivo de prevenção de adulterações na embalagem de certos medicamentos para uso humano de forma a permitir a sua identificação e autenticação (*EUR-Lex*, 2019).

A implementação destas medidas começou a 09 de fevereiro do presente ano e transmitem mais segurança e garantia da qualidade por diminuir a possibilidade de contrafação. Na farmácia, ainda se encontram embalagens antigas, mas a maioria já começa a chegar de acordo com as novas medidas.

3.4. Ameaças

3.4.1. Falta de medicamentos

Cada vez mais se assiste à falta de medicamentos nas farmácias. Segundo o último relatório da Apifarma “Diagnóstico ao (des)abastecimento do mercado farmacêutico em Portugal” de 2016, as principais causas para a falta de medicamentos são: estarem esgotados na cadeia de abastecimento (laboratório/armazenista) e estarem a ser enviados para exportação/mercado paralelo (*APIFARMA*, 2019). Na Farmácia Cardoso, ao

longo do estágio, vários eram os medicamentos cuja disponibilidade era limitada. A maioria, aparecia como esgotado no laboratório, outros, quando contactávamos os fornecedores, estes diziam que estavam sujeitos a rateio. A título de exemplo destes últimos: Aerius® xarope, Trajenta®, Atrovent® unidose, Victoza®... Existem também alguns medicamentos que apenas estão disponíveis na Via Verde do Medicamento, tal como Pradaxa® 150 mg e Eliquis® 2,5 e 5 mg.

3.4.2. Automedicação

Todos os dias na farmácia comunitária nos deparamos com situações de automedicação na qual o farmacêutico deve orientar a utilização do medicamento, de forma a contribuir para uma utilização segura e de acordo com o uso racional do medicamento. Desta forma, é necessário que o farmacêutico, com as devidas competências técnico-científicas, proceda da melhor forma, o que, por vezes, consiste em encaminhar o doente para o médico. Durante o estágio, foram várias as situações, todos os dias, em que tinha de aconselhar de acordo com os conhecimentos adquiridos. Algumas situações estão expostas nos casos clínicos 3 e 4.

Caso Clínico 3 – Referenciação para o médico

Senhora, 60 anos, chegou à farmácia a pedir Magnesium-K Active®. Quando questionada para que efeito seria, respondeu que uma amiga toma e que faz bem aos ossos e ao cansaço. Após mais algumas questões, a senhora referiu que tinha problemas cardíacos. Explicou-se que, tendo em conta a situação de arritmias, podia haver influência a nível cardíaco, pelo que o melhor seria falar com o médico e avaliar a situação, uma vez que o cansaço referido pode ter outra causa subjacente.

Caso Clínico 4 – Automedicação

Senhora, com cerca de 30 anos, foi à farmácia pedir algo para a dor de garganta, uma vez que a sentia irritada e sentia dores ao engolir há 2-3 dias. Quando questionada se tinha algum problema de saúde, esta referiu que tinha asma. Desta forma, algo como Strepsils® poderia já não ser suficiente, sendo necessário a adição de um anti-inflamatório. Tendo em conta que a senhora é asmática, a adição desta classe de compostos deve ser monitorizada pelo médico, tendo em conta a relação benefício/risco.

3.4.3. Plano curricular do MICF

O plano curricular do MICF, apesar de ser bastante diversificado, algumas das unidades curriculares não transmitem o conhecimento adequado para que os alunos possam efetuar o aconselhamento mais assertivo durante a realização do estágio. As unidades curriculares que mais se fizeram sentir como inadequadas foram Dermofarmácia e Cosmética e Preparações de Uso Veterinário. Também o facto de a unidade curricular de Dispositivos Médicos ser opcional, cria uma grande lacuna nos conhecimentos apropriados para um aconselhamento adequado ao longo do estágio.

3.4.4. Dispositivos de segurança nos medicamentos de uso humano

Apesar de os dispositivos de segurança nos medicamentos de uso humano transmitirem mais segurança quanto à qualidade dos medicamentos, por vezes criam alguns constrangimentos no atendimento. Uma das desvantagens de as embalagens virem seladas é o facto de muitas delas não terem a descrição da forma farmacêutica na rotulagem. Desta forma, muitas vezes deparamo-nos com questões como “Dá para abrir a embalagem?”, “Eu só sei que o comprimido é desta cor. Se não dá para ver não sei se é esse ou não.”, “Dá para partir o comprimido a meio?”. Quando se tratava de um doente que não tínhamos histórico, estas questões implicavam que algumas vezes os doentes voltassem a casa para trazer as embalagens ou até preferissem levar outra marca/laboratório que desse para abrir a embalagem e ver os comprimidos.

3.4.5. Receitas Desmaterializadas

A desmaterialização das receitas é um projeto iniciado em 2013 e visa a substituição da receita em papel pelo envio dos dados via circuito eletrónico (*SPMS - Serviços Partilhados do Ministério da Saúde, 2019*).

Ao longo do estágio, várias pessoas se queixavam das receitas serem enviadas via telemóvel, principalmente a população mais idosa, com dificuldade em se adaptar às tecnologias, e pediam para que se imprimisse a receita porque preferiam ter em papel. Normalmente a justificação destes pedidos era para que pudessem ter acesso ao que constava na receita. Muitas pessoas, de forma geral, também se referiam ao facto de

poderem apagar a receita de forma não propositada ou até mesmo o facto de os telemóveis avariarem e deixarem de ter acesso. Em qualquer um destes casos, as pessoas continuam a ter acesso ao Guia de Tratamento no Portal do Utente, que inclui os códigos de acesso e de opção para que a receita possa ser levantada. O que me pude aperceber é que a maioria da população desconhece a existência deste portal e também não sabem como aceder, principalmente as pessoas idosas.

IV. Considerações Finais

O Farmacêutico é um profissional de saúde, dotado de capacidades técnico-científicas, de elevada importância na comunidade. É responsável não só por desenvolver, produzir, e ceder medicamentos sujeitos a critérios de qualidade, eficácia e segurança, mas também por estar atento ao bem-estar geral da comunidade. Por isto, o farmacêutico deve não só identificar e resolver os problemas de saúde, mas também educar as pessoas para aumentar a literacia em saúde e promover atos de prevenção.

A realização do estágio curricular integrado no plano de estudos do MIFC é sem dúvida uma mais valia para os estudantes como forma de transição do ambiente académico para o ambiente profissional. Desta forma, o estágio contribuiu não só para o desenvolvimento profissional, através do aumento dos conhecimentos técnico-científicos com aplicação no dia-a-dia, mas também para o meu desenvolvimento pessoal.

Esta experiência permitiu-me perceber que ainda há um longo caminho a percorrer no que concerne à valorização do ato farmacêutico, tendo em conta que ainda há pessoas que pensam que o farmacêutico apenas vende medicamentos. Contudo, a confiança que a maioria das pessoas deposita em nós é sem dúvida gratificante e leva-me a pensar que fiz a escolha certa.

Para concluir, resta-me apenas agradecer uma vez mais aos meus futuros colegas, por me aceitarem na sua Farmácia, proporcionarem bons momentos que tornaram o estágio bastante acolhedor e, acima de tudo, por transmitirem os seus valiosos conhecimentos que apenas o dia-a-dia de trabalho nos ensina.

PARTE II

**“Avaliação da suscetibilidade *in vitro* à
combinação Ceftazidima-Avibactam em bactérias
multirresistentes isoladas no Centro Hospitalar
da Universidade de Coimbra”**

I. Introdução

1.1. Resistência Antimicrobiana – Uma Preocupação Global

A descoberta de agentes antimicrobianos é considerada um dos maiores sucessos do século XX. Salvaram milhões de vidas e permitiram procedimentos médicos importantes como as cirurgias (Kern, 2015).

Atualmente, a resistência antimicrobiana (AMR) é considerada um problema de saúde pública do século XXI a nível global e abrange bactérias, parasitas, vírus e fungos, colocando em causa a prevenção e tratamento das infeções de forma eficaz (WHO, 2019; Prestinaci, Pezzotti e Pantosti, 2015).

As infeções resistentes aos agentes antimicrobianos causam aproximadamente 23 000 mortes nos Estados Unidos e 25 000 mortes na Europa por ano, e o número é muito maior em países em desenvolvimento (Petchiappan e Chatterji, 2017).

O último relatório da *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* relativo a 2017, mostra que o aumento do nível de resistência a agentes antimicrobianos na Europa varia muito, dependendo do tipo de bactéria, do grupo antimicrobiano e da região geográfica. Esta diferença pode dever-se a variações no uso de antimicrobianos, a práticas de prevenção e controlo de infeções, diferenças nos padrões de diagnóstico e utilização dos serviços de saúde (European Antimicrobial e Network, 2018).

Bacilos Gram-negativo aeróbicos são a causa mais comum de infeções nosocomiais e de cuidados intensivos (Sader *et al.*, 2017).

Durante a última década, tem-se verificado um aumento da resistência a agentes antimicrobianos nos principais agentes patogénicos, principalmente bactérias Gram-negativas, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Eterna da Costa e Machado, 2017; Sherry e Howden, 2018). Segundo a lista publicada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2013 (CDC, 2019) e pela *World Health Organization* (WHO) em 2017 (WHO, 2019), estas bactérias classificam-se como as bactérias mais críticas (prioridade 1) por serem a maior causa de infeções nosocomiais e para as quais as possibilidades de tratamento começam a ser bastante escassas devido à resistência aos agentes antimicrobianos disponíveis, entre outros critérios. Deste modo, é necessário investigar e desenvolver novos agentes antimicrobianos capazes de tratar infeções causadas por estes microrganismos multirresistentes (MDR) (CDC, 2019; WHO, 2019).

1.1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria que infeta predominantemente indivíduos hospitalizados e vulneráveis, originando infeções do trato respiratório inferior, infeções do trato urinário, infeções intra-abdominais e da corrente sanguínea. A maioria das infeções por *K. pneumoniae* está associada a cuidados de saúde e pode disseminar-se rapidamente entre pacientes e através das mãos dos cuidadores, conduzindo a surtos nosocomiais (European Antimicrobial e Network, 2018; Prestinaci, Pezzotti e Pantosti, 2015).

K. pneumoniae pode ser resistente a múltiplos agentes antimicrobianos e a resistência é frequentemente adquirida através de plasmídeos.

A nível da EU/EEA, 34,1% dos isolados *K. pneumoniae* reportados à EARS-Net em 2017 eram resistentes pelo menos a um dos grupos antimicrobianos sob vigilância: fluoroquinolonas (31,5%), cefalosporinas de terceira geração (31,2%), aminoglicosídeos (24,1%) e carbapenemos (7,2%).

Entre 2014 e 2017, Portugal fez parte dos 10 países europeus com maior percentagem de isolados bacterianos resistentes a fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos e carbapenemos, assim como à combinação das três primeiras classes de antimicrobianos. Da mesma forma, Portugal apresentou valores superiores à média europeia no mesmo intervalo de tempo. Os valores referentes a Portugal estão presentes na Tabela 1 (European Antimicrobial e Network, 2018).

Tabela 1. Percentagem de isolados bacterianos resistentes às diferentes classes antimicrobianas, entre 2014 e 2017. (Adaptado de European Antimicrobial e Network, 2018)

Classe antimicrobiana	2014	2015	2016	2017
	%R	%R	%R	%R
Fluoroquinolonas	36,5	38,6	41,7	45,7
Cefalosporinas de 3ª geração	40,9	40,4	46,7	44,9
Aminoglicosídeos	30,5	32,6	35,0	33,5
Carbapenemos	1,8	3,4	5,2	8,6
Fluoroquinolonas + Cefalosporinas de 3ª geração + Aminoglicosídeos	22,8	25,0	27,2	28,4

1.2. Agentes Antimicrobianos

Alexander Fleming e Paul Ehrlich, em meados do século XX, permitiram o começo da “era dos antibióticos” na qual os antibióticos eram vistos como um “fármaco maravilhoso” (Zaman *et al.*, 2017). A descoberta das sulfonamidas nos anos 30 e o subsequente desenvolvimento da penicilina durante a Segunda Guerra Mundial abriu uma nova era ao tratamento de doenças infecciosas (Wright, 2010). O período entre os anos 1950 e 1970 foi considerado a era de ouro na descoberta de novas classes de antibióticos (Zaman *et al.*, 2017).

1.2.1. Mecanismos de Ação

Um agente antimicrobiano ideal deve ter uma toxicidade seletiva, isto é, o agente antimicrobiano deve ser prejudicial ao agente patogénico sem ser prejudicial ao hospedeiro (Brooks *et al.*, 2013).

Os agentes antimicrobianos têm como principais alvos: a parede celular (ex: cefalosporinas e carbapenemos), a membrana celular (ex: polimixinas), a síntese proteica (ex: aminoglicosídeos e tetraciclina), a síntese de ácidos nucleicos (ex: quinolonas) e o metabolismo do ácido fólico (vitamina B9) (ex: sulfonamidas), representados na Figura 4. Estes alvos bacterianos são diferentes ou mesmo inexistentes em células eucarióticas, pelo que não apresentam toxicidade para o organismo humano (Wright, 2010; Petchiappan e Chatterji, 2017; Guimarães, Moura e Soares da Silva, 2014).

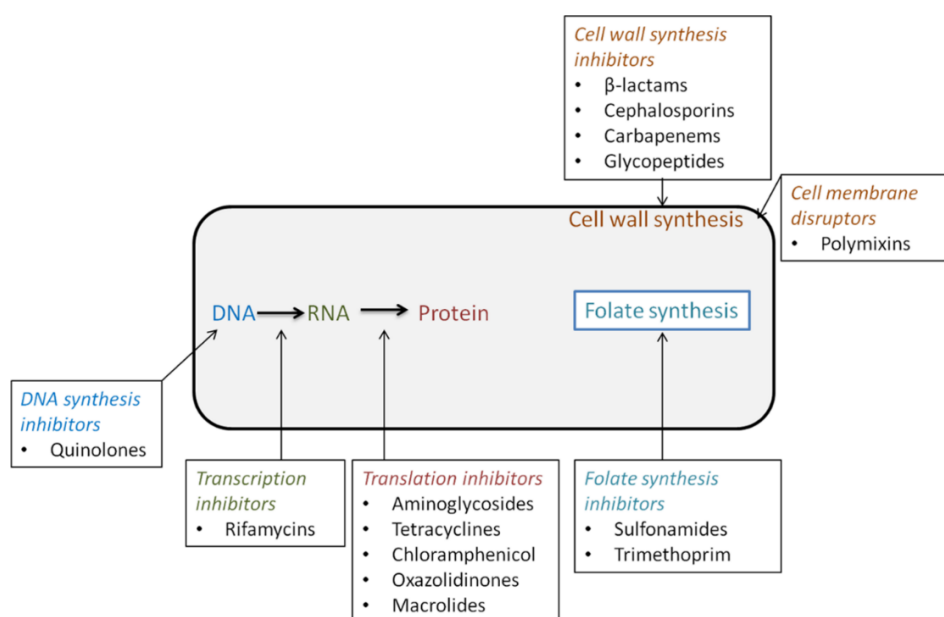


Figura 4 – Diferentes classes de agentes antimicrobianos e seus mecanismos. (Adaptado de Petchiappan e Chatterji, 2017)

1.2.2. Mecanismos de Resistência

Entende-se por resistência antimicrobiana a capacidade de os microrganismos resistirem ao efeito de um ou mais agentes antimicrobianos, continuando a multiplicar-se no organismo (CDC, 2019; European Antimicrobial e Network, 2018).

A AMR é um fenómeno ecológico (Eterna da Costa e Machado, 2017) e natural que ocorre como resposta evolutiva à pressão seletiva resultante da exposição a estes compostos (Wright, 2010).

Podemos dividir a resistência em três categorias: isolados MDR que são resistentes a pelo menos 1 agente em ≥ 3 categorias de antimicrobianos, isolados XDR que são resistentes a pelo menos 1 agente em ≤ 2 grupos e isolados PDR (“pan-drug-resistant”) que são resistentes a todos os agentes de todos os grupos (Sherry e Howden, 2018).

A AMR está relacionada com várias vertentes, nomeadamente: o uso na medicina humana, tanto a nível hospitalar como em situações de automedicação; o uso na agricultura e na produção animal que constituem uma grande porção do uso total de agentes antimicrobianos; e por último uma vertente ambiental. Relativamente ao último ponto, o solo é visto como um reservatório de genes de resistência aos agentes antimicrobianos e são encontradas grandes quantidades destes nas águas residuais municipais devido ao metabolismo incompleto em seres humanos ou mesmo devido ao descarte de agentes antimicrobianos não utilizados (Prestinaci, Pezzotti e Pantosti, 2015). Deste modo, microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos são encontrados em pessoas, animais, comida e no meio ambiente (água, solo, ar). Estes microrganismos podem disseminar entre os diversos meios (meio ambiente – animais – pessoas) (WHO, 2019).

Existem vários mecanismos de AMR, os quais se vão disseminando e aumentando a mortalidade e morbidade das infeções assim como os custos associados (WHO, 2019; Sader *et al.*, 2017).

A AMR pode ser adquirida pela bactéria através de mutações cromossómicas ou por transferência horizontal de genes a partir de outras bactérias. A AMR numa bactéria pode desenvolver-se principalmente através de três mecanismos como ilustrado na Figura 5 (Petchiappan e Chatterji, 2017; Mo *et al.*, 2019):

- a) Diminuição do influxo ou aumento do efluxo dos agentes antimicrobianos – a diminuição da expressão celular de porinas ou mutações nos seus genes diminuem a entrada do agente antimicrobiano na bactéria; a presença de bombas de efluxo

assim como mutações nos seus genes ou a sua sobre-expressão conduz a um aumento do efluxo do agente antimicrobiano da bactéria;

- b) Modificação dos agentes antimicrobianos – quando o agente antimicrobiano entra na bactéria, existem enzimas que podem degrada-lo de forma a que não se consiga ligar ao alvo (β -lactamases degradam os β -lactâmicos); ou modifica-lo, diminuindo a afinidade para o alvo e conseqüentemente a eficácia (acetiltransferases modificam os aminoglicosídeos) (Petchiappan e Chatterji, 2017; Guimarães, Moura e Soares da Silva, 2014);
- c) Modificação do alvo dos agentes antimicrobianos – pode ocorrer através de mutações nos alvos em si mesmos através da produção de enzimas que os modificam (Wright, 2010; Guimarães, Moura e Soares da Silva, 2014).

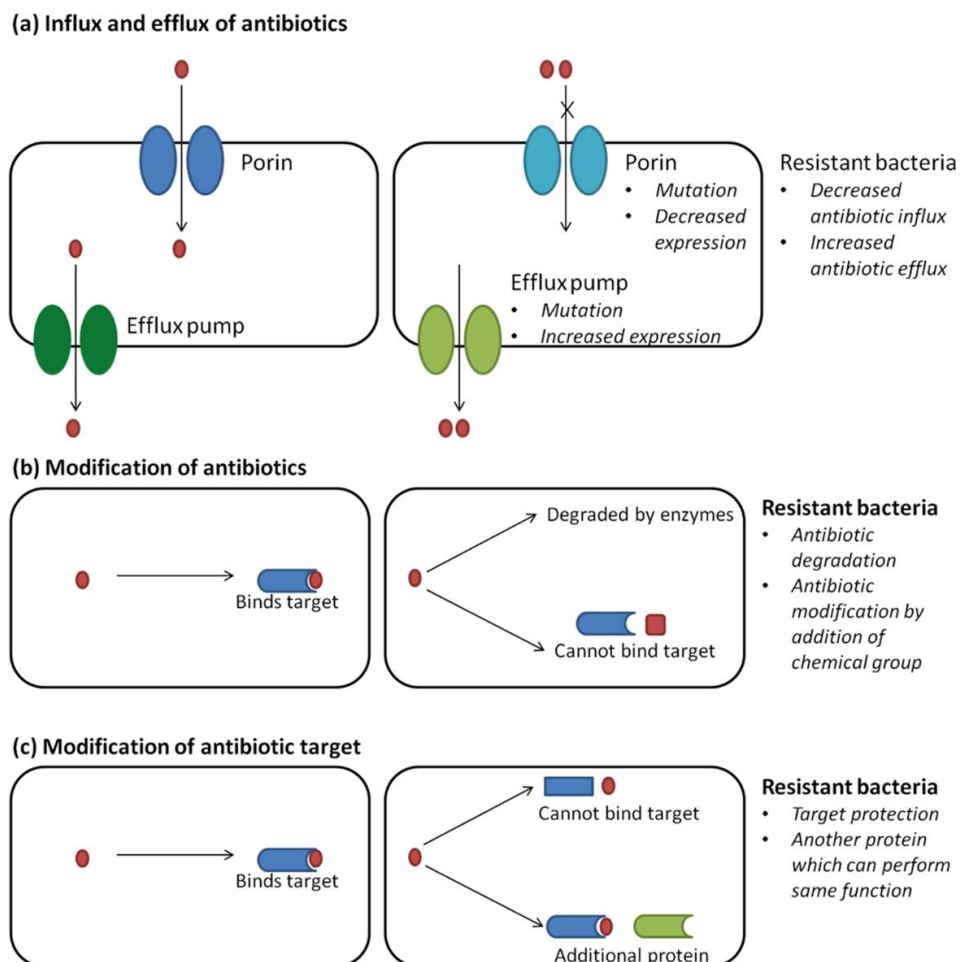


Figura 5 – Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos. (a) alteração do efluxo; (b) modificação dos agentes antimicrobianos; (c) modificação dos alvos dos agentes antimicrobianos. Adaptado de (Petchiappan e Chatterji, 2017)

Cada um destes mecanismos pode manifestar-se de forma isolada ou em combinação num microrganismo, complicando a identificação do mecanismo de resistência (Arizpe *et al.*, 2016).

1.3. β -lactamases

Os agentes antimicrobianos β -lactâmicos (BL) (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactamos) partilham o núcleo fundamental, o anel β -lactâmico, e inibem a síntese do peptidoglicano da parede bacteriana (Guimarães, Moura e Soares da Silva, 2014). Os β -lactâmicos são o tratamento mais comum para infecções bacterianas (Shaikh *et al.*, 2015). Contudo, um dos mecanismos de resistência das bactérias Gram-negativas a estes agentes antimicrobianos são as β -lactamases (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018) – enzimas que inativam os BL por hidrólise (Jeon *et al.*, 2015).

As β -lactamases são comumente designadas de acordo com duas classificações (Shaikh *et al.*, 2015). A classificação molecular de Ambler é a mais usada (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018) e distingue as β -lactamases em quatro classes de acordo com a estrutura molecular do centro ativo da enzima: as classes A, C e D são serina β -lactamases e a classe B são metalo- β -lactamases (MBL) (com zinco no local ativo) (Tabela 2). Segundo a classificação funcional de Bush–Jacoby–Medeiros de 1995 e de Bush e Jacoby de 2010, as β -lactamases são classificadas de acordo com as propriedades funcionais das enzimas (Guimarães, Moura e Soares da Silva, 2014).

Tabela 2. β -lactamases segundo a classificação de Ambler. (Adaptado de Thaden, Pogue e Kaye, 2017 e Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowsky, 2014)

Classe de Ambler	β -lactamases	Local ativo	Exemplos	Substratos
A	Penicilinas	Serina	TEM, SHV, CTX-M, GES, SME	Penicilinas, cefalosporinas de 3ª geração
			KPC	Todos os β -lactâmicos
B	Metallo- β -lactamases	Zinco	IMP, VIM, NDM, PER, VEB	Todos os β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos
C	Cefalosporinas	Serina	AmpC, FOX, CMY, LAT, DHA	Cefamicinas, cefalosporinas de 3ª geração
D	Oxacilinas	Serina	OXA,	Todos os β -lactâmicos (espectro de atividade depende da enzima)

A maioria das bactérias Gram-negativas MDR apresentam mais do que uma β -lactamase (Papp-Wallace e Bonomo, 2016). A frequência de *Enterobacteriaceae* com elevada resistência aos agentes antimicrobianos com β -lactamases de largo espectro (ESBLs) e carbapenemases tem aumentado rapidamente, tornando-se numa ameaça para os pacientes com infecções causadas por estes organismos (Draenert *et al.*, 2015).

1.3.1. β -lactamases de largo espectro – ESBLs

A exposição das bactérias aos β -lactâmicos induziram uma produção e mutação dinâmica e contínua das β -lactamases, expandindo a sua atividade mesmo contra novos β -lactâmicos (Shaikh *et al.*, 2015).

As β -lactamases de largo espectro são um grupo de enzimas que hidrolisam os agentes antimicrobianos pertencentes ao grupo das penicilinas, cefalosporinas de espectro alargado e monobactams, tornando-os inefetivos (Shaikh *et al.*, 2015; Arizpe *et al.*, 2016)

Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs estão entre as bactérias MDR mais importantes e prevalentes (Sheu *et al.*, 2018), como *E. coli*, *K. pneumoniae*, espécies *Enterobacter* e *Proteus mirabilis*, sendo as duas primeiras as que provocam mais infeções.

Passados mais de 30 anos após a descoberta da primeira bactéria produtora de ESBL, existem vários genótipos que podem diferir apenas na posição de alguns aminoácidos, afetando a capacidade de hidrólise das β -lactamases (Sheu *et al.*, 2018). As β -lactamases mais difundidas por todo o mundo são CTX-M-14, CTX-M-15 e SHV-12 (Compain, Dorchène e Arthur, 2018; (Karlowisky *et al.*, 2016). Apesar disso, durante a última década, têm sido reportados vários surtos de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs, a maioria derivadas de *bla_{TEM-1}*, *bla_{TEM-2}* ou *bla_{SHV-1}* (Yigit *et al.*, 2003).

1.3.2. Carbapenemases

Com o aumento da resistência às cefalosporinas de espectro alargado, os carbapenemos tornaram-se na escolha terapêutica. Os carbapenemos – como por exemplo, meropenemo, ertapenemo e imipenemo – são frequentemente utilizados no tratamento de infeções causadas por organismos multirresistentes, incluindo os produtores de ESBLs (Yigit *et al.*, 2003; Sheu *et al.*, 2018; Potter *et al.*, 2016) No entanto, o seu uso acrescido conduziu ao aparecimento de bactérias resistentes (Hackel *et al.*, 2016), particularmente entre *K. pneumoniae* e *E. coli* (Shanmugam, Meenakshisundaram e Jayaraman, 2013).

A resistência aos carbapenemos pode ser mediada por três mecanismos: a produção de β -lactamases capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico – carbapenemases; a hiperprodução da cefalosporinase AmpC cromossomal combinada com baixa permeabilidade da membrana bacteriana pela perda ou alteração das porinas; e, menos comum, a alteração da afinidade dos carbapenemos para as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) (Yigit *et al.*, 2003; (Shanmugam, Meenakshisundaram e Jayaraman, 2013; Potter *et al.*, 2016).

As carbapenemases são o mecanismo de resistência mais importante a nível clínico tendo em conta que estas enzimas hidrolisam todos ou quase todos os β -lactâmicos, conferem elevados níveis de concentração mínima inibitória (MIC) aos carbapenemos, são codificadas por genes que podem ser transferidos horizontalmente por plasmídeos e são comumente associadas a genes que codificam outros mecanismos de resistência (Meletis, 2016; Lee e Doi, 2014), tornando o tratamento destas infeções mais difícil (Yigit *et al.*, 2003).

A disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases é uma grande preocupação de saúde pública (Jayol *et al.*, 2018). Na Europa foram reportadas *K. pneumoniae* com carbapenemases KPC, NDM, OXA-48-like ou VIM (European Antimicrobial e Network, 2018).

O gene *bla_{KPC}* está presente no transposição *Tn4401* (Rodrigues *et al.*, 2016; Bouchillon, Sahm e Bradford, 2016) e plasmídeos de diferentes grupos (*IncFIA*, *IncI2*, *IncX3*) (Rodrigues *et al.*, 2016) que são elementos genéticos móveis com genes de resistência exógenos capazes de se disseminarem horizontalmente entre bactérias (European Antimicrobial e Network, 2018) de diferentes géneros como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Citrobacter* e outros bacilos Gram-negativos (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018). *K. pneumoniae* é a espécie mais isolada com KPC, seguida de *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* (Bouchillon, Sahm e Bradford, 2016). KPC é a carbapenemase mais encontrada globalmente, com várias variantes reportadas, das quais se destaca a KPC-2 e KPC-3 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; Rodrigues *et al.*, 2016).

Existem publicações que descrevem a deteção de Enterobactérias produtoras de carbapenemases (CPE) em amostras de água, como por exemplo, *E. coli* produtora de KPC em Portugal e *Serratia marcescens* produtora de OXA-48 em Marrocos, o que permite concluir que as fontes de CPE vão para além do hospital (Magiorakos *et al.*, 2013).

1.4. Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos

As Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos (CRE) são uma ameaça particular para a saúde global tendo em conta que os carbapenemos são considerados como fármacos de “última linha” no tratamento de infeções por bactérias Gram-negativo resistentes aos agentes antimicrobianos (Thaden, Pogue e Kaye, 2017). Com a emergência das CRE, compostos mais tóxicos, como as polimixinas (colistina e a polimixina B) são uma

alternativa ao tratamento de infecções com origem nestas bactérias (Duin, Van *et al.*, 2018; Sader *et al.*, 2014), assim como a tigeciclina, fosfomicina e aminoglicosídeos (Sader *et al.*, 2017). Contudo, resistências contra estes agentes antimicrobianos também começam a aparecer (Li *et al.*, 2019).

Um caso particular, recente e emergente, é a resistência aos carbapenemos em *K. pneumoniae* mediada por uma série de carbapenemases, que podem conferir resistência virtualmente a todos os antibacterianos β -lactâmicos disponíveis (European Antimicrobial e Network, 2018).

As infecções causadas por CRE, como é o caso das bactérias das espécies de *Klebsiella spp.*, são um dos exemplos de bactérias consideradas ameaças urgentes que têm aumentado entre os pacientes em instalações médicas, resistentes a quase todos os agentes antimicrobianos disponíveis atualmente (CDC, 2019).

As estirpes produtoras de KPC parecem apresentar maior transmissibilidade que as demais CRE. A colonização com CRE está associada a um risco aumentado de infecção por estas bactérias, com uma mortalidade associada que pode chegar aos 60%.

Em Portugal, assiste-se nos últimos anos a um crescimento significativo de CRE, com a ocorrência de surtos hospitalares esporádicos (Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos, 2017).

II. Novos Agentes antimicrobianos e Associações

A prevalência de organismos nosocomiais resistentes e multirresistentes tem aumentado rapidamente tanto para bactérias Gram-positivas como para bactérias Gram-negativas.

É urgente o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos tendo em conta o avanço da resistência contra todos os agentes antimicrobianos no mercado e em uso clínico. Vários compostos têm sido desenvolvidos em várias classes e contra bactérias MDR, como ilustrado na Figura 6 (Draenert *et al.*, 2015).

Contudo, os novos agentes antimicrobianos estão a ser mantidos em reserva para os casos em que nenhum antigo é efetivo. A maior parte dos agentes antimicrobianos aprovados desde a década de 1970 ou os que estão em desenvolvimento são derivados de outros previamente aprovados contra os mecanismos de resistência existentes.

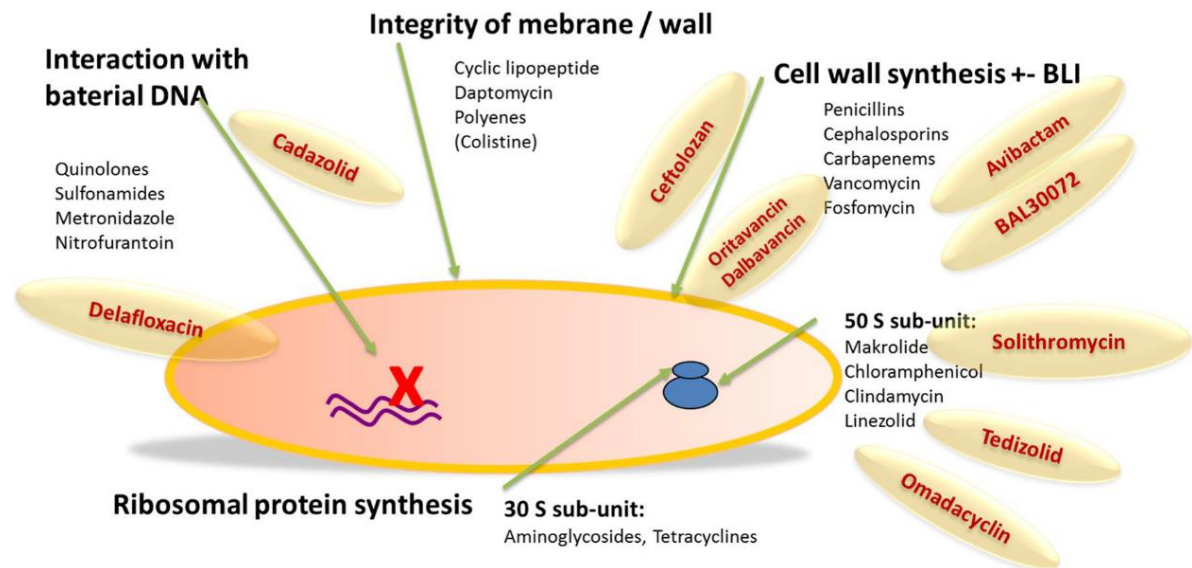


Figura 6 – Visão geral de novos compostos. (Adaptado de Draenert *et al.*, 2015)

Apesar do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, surgirão mecanismos de resistência contra estes, pelo que podem ser exploradas abordagens adicionais como, por exemplo, adjuvantes. Os adjuvantes de agentes antimicrobianos são compostos que não matam a bactéria, mas aumentam o efeito pretendido, por exemplo, inibindo um mecanismo de resistência. Estes adjuvantes podem inibir um mecanismo de resistência intrínseco permitindo expandir o espectro de atividade assim como podem aumentar a suscetibilidade bacteriana tornando o agente antimicrobiano eficaz em doses mais baixas, o que no caso da colistina, por exemplo, permitiria reduzir os efeitos adversos.

Um exemplo de adjuvante de agentes antimicrobianos, clinicamente aprovado, são os inibidores de β -lactamases (BLI). Estes, em combinação com os agentes antimicrobianos β -lactâmicos, têm sido utilizados há mais de 30 anos para o tratamento de infeções por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Melander e Melander, 2017).

Os primeiros BLIs no uso clínico foram o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. No entanto, hoje em dia a resistência a estes BLIs está bastante presente de modo que, combinações como amoxicilina-ácido clavulânico e piperacilina-tazobactam tornaram-se incapazes de inativar as β -lactamases expressas em isolados MDR (Papp-Wallace e Bonomo, 2016).

Os novos BLI são capazes de inibir outras classes em diferentes graus, contribuindo para o combate de ESBLs e KPC, como por exemplo: avibactam (Draenert *et al.*, 2015), vaborbactam e relebactam (Sutaria *et al.*, 2018). O desenvolvimento contínuo de novos inibidores de β -lactamases que incluam as metalo- β -lactamases e as β -lactamases OXA

continua a ser uma importante área de desenvolvimento, atendendo ao número de variantes que existem (Melander e Melander, 2017; Papp-Wallace e Bonomo, 2016).

2.1. Ceftazidima-Avibactam

Atendendo à evolução e disseminação dos mecanismos de resistência, surgiu a necessidade de criar novas alternativas aos carbapenemos, tais como a associação do avibactam à ceftazidima ou aztreonam, o que parece ser bastante promissor comparando com a utilização da colistina ou a tigeciclina (Potter *et al.*, 2016).

Ceftazidima (CAZ) (Figura 7) é uma cefalosporina de terceira geração do grupo dos β -lactâmicos, introduzida no uso clínico nos anos 1980 e apresenta um largo espectro de ação (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowsky, 2014; Karlowsky *et al.*, 2016).

Tal como os restantes β -lactâmicos, atua por ligação às proteínas de ligação à penicilina, preferencialmente a PBP3 de bactérias Gram-negativas, inibindo a síntese da parede celular (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowsky, 2014).

O principal mecanismo de resistência contra a ceftazidima é a produção de β -lactamases, seguido de outros mecanismos como alterações na permeabilidade, que podem estar associados à sobre expressão de carbapenemases (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018).

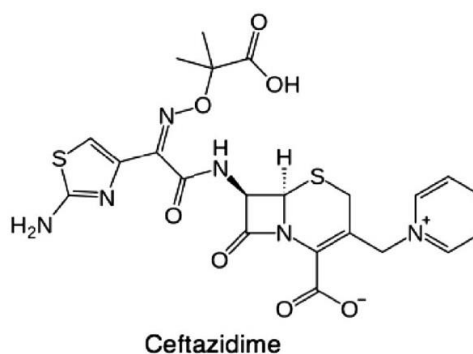
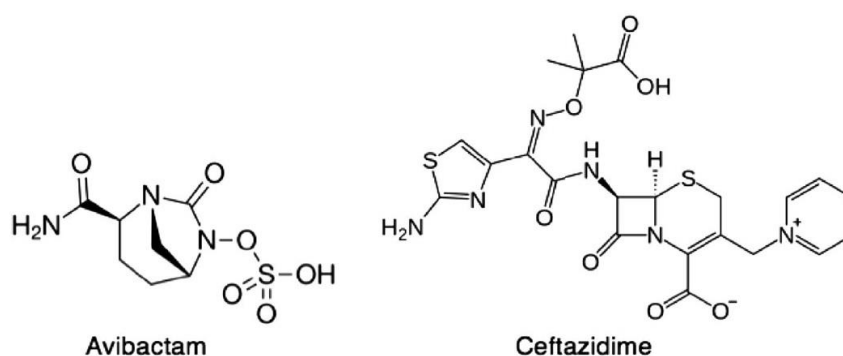


Figura 7 – Estrutura molecular de avibactam e ceftazidima. (Adaptado de Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018)

Avibactam (AVI) é um inibidor de β -lactamases (BLI) não β -lactâmico pertencente ao grupo dos diazabicyclooctanos (DBOs) (Figura 7). A partir deste BLI foram criadas associações com a ceftazidima (CZA) e a ceftarolina (CEF-AVI).

Enquanto os inibidores com estrutura β -lactâmica sofrem um rearranjo após a abertura do anel, avibactam não sofre. Após a abertura do anel, a estrutura é estabilizada por interações polares com os resíduos perto do local ativo (Coleman, 2011). Assim, o avibactam inibe as β -lactamases através de uma acilação covalente no resíduo serina. Esta ligação é parcialmente reversível, pelo que torna o avibactam reciclável após a desacilação em vez de ser hidrolisado, restaurando a sua atividade (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowky, 2014; Ehmann *et al.*, 2012). No caso particular de KPC-2, apesar de ser rapidamente acilada pelo avibactam, a reação de desacilação do complexo acil-avibactam é lenta, o que resulta na hidrólise e fragmentação da molécula de avibactam (Bush, 2015).

Avibactam inibe a atividade de β -lactamases de classe A (ESBLs e KPC), classe C (AmpC) e algumas de classe D (OXA-24, OXA-48, OXA-69 e OXA-10) (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018; Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowky, 2014; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; Hidalgo, Vinluan e Antony, 2016; Shirley, 2018). Não apresenta atividade contra a classe B tendo em conta que estas enzimas não têm o resíduo serina no local ativo. De assinalar ainda que não apresenta atividade contra *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp., nem contra a maioria dos organismos Gram-negativos anaeróbios assim como os Gram-positivos (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowky, 2014; Sherry e Howden, 2018). O caso particular de *Acinetobacter baumannii* deve-se à presença de carbapenemases OXA-51-like intrínsecas e a carbapenemases adquiridas como OXA-23, OXA-40 e OXA-58-like, que são fracamente inibidas pelo avibactam (Sherry e Howden, 2018; Keepers *et al.*, 2014; Sutaria *et al.*, 2018). Para além da ligação às β -lactamases, o avibactam também pode estabelecer uma ligação covalente com algumas PBP: a PBP2 de *E. coli* e *Haemophilus influenzae*, as PBPs 2 e 3 de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e a PBP3 de *Streptococcus pneumoniae* (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018; Asli *et al.*, 2016).

Em comparação com outros BLIs, o avibactam apresenta várias vantagens: o complexo avibactam- β -lactamase não sofre hidrólise, o complexo é reversível por desacilação, consegue uma interação efetiva com resíduos catalíticos próximos do local ativo das β -lactamases (Thaden, Pogue e Kaye, 2017), apresenta um pequeno tamanho molecular e um baixo peso molecular (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018). Para além disso, avibactam é o primeiro BLI ativo contra enzimas da classe C (López-Hernández *et al.*, 2017).

Tendo em conta que o avibactam inibe eficazmente a enzima KPC (melhor que o ácido clavulânico e o tazobactam) (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowky, 2014), permite que a

ceftazidima volte a ter atividade contra *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC. Esta atividade foi demonstrada em estudos in vivo nos quais 98% de isolados CRE com carbapenemases KPC ou OXA-48 foram suscetíveis à associação de ceftazidima-avibactam. Esta suscetibilidade persistia mesmo em situações de co-produção de β -lactamases como ESBLs e/ou AmpC (Thaden, Pogue e Kaye, 2017).

AVI também apresenta atividade contra isolados de *P. aeruginosa* resistentes a meropenemo, que também apresentam resistência aos BLIs de primeira geração assim como contra isolados de *P. aeruginosa* que apresentem o gene AmpC desreprimido, sendo intrinsecamente resistentes à ceftazidima (Hidalgo, Vinluan e Antony, 2016).

Ceftazidima-Avibactam (CZA) é uma nova combinação de uma cefalosporina de terceira geração com um inibidor de β -lactamases com atividade bactericida (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowsky, 2014; Keepers *et al.*, 2014; Barber *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018).

A adição do avibactam expande o espectro de atividade da ceftazidima a várias enterobactérias multirresistentes, incluindo as produtoras de ESBLs e carbapenemases (Jayol *et al.*, 2018).

Nos Estados Unidos da América (EUA), foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em fevereiro de 2015 com o nome Avycaz[®], enquanto que na União Europeia (UE) foi aprovado em junho de 2016 pela *European Medicines Agency* (EMA) sob o nome Zavicefta[®] (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

Ceftazidima-avibactam está disponível numa formulação intravenosa (IV) com um rácio de 4:1 contendo 2 000 mg de CAZ e 500 mg de AVI (Hidalgo, Vinluan e Antony, 2016). De facto, estudos mostram que a adição do avibactam melhora significativamente a ação da ceftazidima *in vitro* contra isolados de *Enterobacteriaceae*, sendo 500 mg suficientes para restaurar a eficácia da ceftazidima (MacVane *et al.*, 2014; Levasseur *et al.*, 2014; Berkhout *et al.*, 2015; Keepers *et al.*, 2014).

A combinação ceftazidima-avibactam está aprovada para o tratamento de infeções em adultos, nomeadamente: infeções complicadas intra-abdominais (cIAIs), infeções complicadas do trato urinário (cUTIs), incluindo pielonefrite, e para pneumonia adquirida no hospital (HAP), incluindo pneumonia associada a ventilação mecânica (VAP). Na UE está também indicado para o tratamento de infeções causadas por microrganismos aeróbios Gram-negativos multirresistentes (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; European Medicines Agency, 2016). No caso de cIAIs, a associação de

ceftazidima-avibactam com metronidazol parece ser uma boa alternativa aos carbapenemos (Mazuski *et al.*, 2016).

No entanto, um estudo mostra que não há uma diferença significativa no tratamento de cIAI com novos BL/BLIs face aos carbapenemos. Pelo contrário, em casos de cUTI, houve um sucesso significativo face a outros agentes antimicrobianos (Chen *et al.*, 2018).

Esta combinação surgiu para o tratamento de infeções por bactérias Gram-negativo multirresistentes, especialmente as CRE, exceto aquelas que possuem carbapenemases MBL (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). Em relação às enzimas OXA-48-like, a sua atividade pode ser devido à presença de ESBLs que costumam ser co-transportadas com as primeiras (Sherry e Howden, 2018).

Ceftazidima-avibactam apresenta boa atividade *in vitro*, mas, atendendo aos restantes agentes antimicrobianos e aos custos associados, acaba por não ter um papel significativo no tratamento de infeções causadas por organismos produtores de ESBLs (Arizpe *et al.*, 2016). Em Portugal, a sua utilização é bastante restrita a situações excecionais e de acordo com a autorização da direção clínica.

Os dados sugerem que a combinação CZA tem boa eficácia e segurança, com um perfil semelhante aos agentes antimicrobianos β -lactâmicos utilizados na rotina clínica (Gardiner e Golan, 2016). Contudo, um ensaio mostrou que, no tratamento de pneumonia associada a ventilação mecânica, ceftazidima-avibactam pode apresentar um maior risco de eventos adversos graves comparando com meropenemo (Torres *et al.*, 2018; Mehta e Uhlemann, 2018; Kalil e Klompas, 2017). A nível gastrointestinal, ceftazidima-avibactam apresenta um impacto significativo na microbiota intestinal, podendo levar a disbiose (Rashid *et al.*, 2015). Ter também em consideração que avibactam é um substrato dos transportadores de aniões orgânicos (OAT) OAT1 e OAT3 *in vitro*, pelo que pode sofrer acumulação quando administrado com inibidores dos OAT, como o probenecida (Chahine, Sourial e Ortiz, 2015).

Na literatura, existem já vários casos clínicos reportados de tratamentos com a combinação ceftazidima-avibactam, isolada ou em combinação com outros agentes antimicrobianos: tromboflebitis sépticas (CZA+ERT) (Iacovelli *et al.*, 2018), bacteriemia causada por *Burkholderia cepacia* (CZA) (Tamma *et al.*, 2018), profilaxia de doentes com fibrose cística durante transplante de pulmão (CZA) (Los-Arcos *et al.*, 2019), bacteriemia causada por *Morganella morganii* produtora da carbapenemase NDM-1 e cefalosporinases (CZA+ATM) (Hobson *et al.*, 2019).

III. Resistências à Ceftazidima-Avibactam

O aparecimento de resistência à combinação ceftazidima-avibactam é uma situação preocupante, na medida em que tem emergido muito rapidamente após a sua comercialização em 2015. A resistência a esta combinação tem sido reportada maioritariamente na família *Enterobacteriaceae*, destacando-se os clones *K. pneumoniae* ST258, ST307 e ST1519 com o gene *bla_{KPC}* (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

O principal mecanismo de resistência à CZA é a presença de β -lactamases que não são inativadas pelo avibactam, como a classe B e a maioria das β -lactamases da classe D. Uma forma de ultrapassar a resistência à combinação CZA devida às metalo-B-lactamases pode ser a adição de aztreonam. Os estudos realizados, embora envolvam poucos isolados clínicos, demonstram que a combinação de ceftazidima-avibactam com aztreonam apresenta um efeito sinérgico contra bactérias Gram-negativas produtoras de ESBLs + MBLs, o que pode ser explicado pela neutralização das ESBLs pelo avibactam, devolvendo a suscetibilidade ao aztreonam (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018; Jayol *et al.*, 2018; Davido *et al.*, 2017; Aitken *et al.*, 2016; Monogue *et al.*, 2017; Marshall *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2015; Mischnik *et al.*, 2017; Emeraud *et al.*, 2019).

Outros mecanismos envolvidos são a reduzida permeabilidade devido a alterações nas porinas e bombas de efluxo (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018; Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowsky, 2014), o que parece ser também um fator importante (Papp-Wallace e Bonomo, 2016). Estes mecanismos não são inibidos pelo avibactam, pelo que os organismos resistentes aos β -lactâmicos apenas por estes mecanismos continuarão resistentes apesar da adição do inibidor das β -lactamases (Lagacé-Wiens, Walkty e Karlowsky, 2014). Deste modo, a ocorrência de mutações nas PBPs associadas a resistência à ceftazidima trata-se de um mecanismo não reversível pela adição do avibactam (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018).

Apesar do amplo espectro de ação da ceftazidima, enzimas como SHV-10 e TEM-30 não são inibidas pelas DBOs (Coleman, 2011). Em relação à penicilinase SHV-1, algumas variantes podem ser resistentes ao avibactam por mutações pontuais a nível dos aminoácidos (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018; Duin, van e Bonomo, 2016), particularmente a nível da Ser130 (S130G) (Bush, 2015; Winkler *et al.*, 2015). Da mesma forma as β -lactamases TEM e CTX-M podem sofrer algumas mutações que alteram a interação β -lactamase-ceftazidima, aumentando a atividade ceftazidimase (Livermore *et al.*, 2015). No caso das β -lactamases CTX-M mais comuns: CTX-M-14 apresenta uma

atividade ceftazidimase aumentada induzida pelo polimorfismo em P170S (Both *et al.*, 2017); já a CTX-M-15, Compain *et al.* demonstrou que a resistência apenas ocorre com a alteração de dois aminoácidos e está restrita a variantes com Q na posição 169 (Compain, Dorchène e Arthur, 2018).

O primeiro caso de resistência à combinação ceftazidima-avibactam em *K. pneumoniae* produtora de KPC-3 foi descrito em 2015 (Humphries *et al.*, 2015).

Winkler *et al.* demonstrou que a carbapenemase KPC-2 pode apresentar mutações, nomeadamente, Arg164Ala, Arg164Pro, Asp179Ala, Asp179Gln e Asp179Asn, para as quais CZA apresenta MICs >8 mg/ml (Winkler, Papp-Wallace e Bonomo, 2015). Hemarajata e Humphries demonstraram também resistência a CZA resultado da mutação L169P no omega-loop de KPC-2 (Hemarajata e Humphries, 2019). Tal como para *bla_{KPC-3}*, estudos reportam o desenvolvimento de mutações D179Y no gene *bla_{KPC-2}* durante o tratamento com CZA (Giddins *et al.*, 2018; Compain e Arthur, 2017). Outro estudo reporta também o aparecimento de *K. pneumoniae* resistente após tratamento com CZA. O isolado apresentava o gene *bla_{KPC-2}* que codificava a proteína KPC-2 com uma inserção de 15 aminoácidos (Räisänen *et al.*, 2019).

Relativamente às CRE, em particular no caso de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, os mecanismos de resistência incluem mutações no gene *bla_{KPC}* e diferente suscetibilidade entre os subtipos de KPC (ex: KPC-2 e KPC-3) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). Isolados com KPC-3 apresentam o dobro da concentração mínima inibitória comparando com KPC-2. Isto pode acontecer devido à elevada capacidade hidrolítica da KPC-3 contra a ceftazidima (Manning *et al.*, 2017), assim como devido a uma possível ligação covalente do avibactam à carbapenemase KPC-3 com menor afinidade do que à KPC-2 (Shields *et al.*, 2015).

Em casos de *Enterobacteriaceae* resistentes à colistina, a atividade de ceftazidima-avibactam foi independente da presença de bombas de efluxo e da perda de porinas. No entanto, um estudo da China mostrou que uma menor suscetibilidade era causada pela elevada capacidade hidrolítica da ceftazidima e pela deficiência na porina OmpK35 (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018). O mesmo mecanismo foi reportado num isolado *Klebsiella pneumoniae* ST258 produtor de KPC-23 (Galani *et al.*, 2019). A perda de OmpK35 reduz também a suscetibilidade por reduzir a entrada de ceftazidima (Manning *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2017).

P. aeruginosa também podem apresentar alguma resistência mediada pela diminuição da permeabilidade da parede celular e pelo aumento da produção de bombas de efluxo

(Duin, van e Bonomo, 2016; Winkler *et al.*, 2015). Fraile-Ribot *et al.* descreveram o aparecimento de resistência durante o tratamento com CZA num isolado *P. aeruginosa* com OXA-539 (Fraile-Ribot *et al.*, 2017). Para combater a resistência de *P. aeruginosa* a CZA, já existe um estudo que mostra a sinergia de ceftazidima-avibactam com fosfomicina (Papp-Wallace *et al.*, 2019).

IV. Objetivos

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento significativo de infeções causadas por bactérias produtoras de KPC (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018).

Em Portugal, verifica-se a disseminação de ESBLs, maioritariamente CTX-M-15, TEM-24, TEM-52 e SHV-12, em *Enterobacteriaceae* a nível hospitalar. A recente identificação de isolados produtores de KPC aumentaram o alerta. (Novais *et al.*, 2012). Pouco é sabido sobre a epidemiologia molecular das CPE. Apenas alguns isolados esporádicos foram descritos: um isolado de *Klebsiella oxytoca* produtora de VIM-2, dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de VIM-34 e seis isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC-3 (Manageiro *et al.*, 2015). Em 2009 foi detetado o primeiro isolado produtor de KPC-3 num hospital central. Mais tarde, um estudo nacional reportou 22 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-3 em vários hospitais (Rodrigues *et al.*, 2016). Apenas recentemente se tem assistido à disseminação de isolados produtores de KPC em Portugal (Bouchillon, Sahn e Bradford, 2016; Vubil *et al.*, 2017; Cantadeiro, 2018).

Este trabalho teve como objetivo principal o estudo da suscetibilidade à combinação Ceftazidima-Avibactam em bactérias multirresistentes produtoras de carbapenemases, isoladas em doentes do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC) entre novembro de 2016 e agosto de 2017.

V. Material e Métodos

5.1. Isolados bacterianos

Para a realização do trabalho foram usados 100 isolados bacterianos multirresistentes, recolhidos de amostras clínicas no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra:

Klebsiella pneumoniae (n = 94), *Klebsiella oxytoca* (n = 4), *Serratia marcescens* (n = 1) e *Acinetobacter baumannii* (n = 1).

5.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana

O perfil de suscetibilidade foi obtido a partir de um sistema automatizado utilizado no CHUC, nomeadamente o Vitek 2 Advanced Expert System - AES (BioMérieux, Portugal), de acordo com as normas europeias *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

No Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, foi realizado novo teste de suscetibilidade segundo o método de difusão do disco, também conhecido pelo método de *Kirby-Bauer*, para analisar a suscetibilidade ao agente antimicrobiano em estudo: ceftazidima-avibactam. Para este método, preparou-se uma suspensão bacteriana com uma turvação similar à de 0.5 na escala de *McFarland*, seguidamente espalhada numa placa de agar *Mueller-Hinton* (MH) recorrendo a uma zaragatoa. Colocou-se os discos de agentes antimicrobianos ceftazidima e ceftazidima-avibactam (Oxoid) na placa que foi incubada a uma temperatura de 37°C durante 18-24 horas. A interpretação dos resultados teve como base as normas *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, atendendo à concentração dos discos (CAZ 30 µg e CZA 30/20 µg).

5.3. Detecção molecular e identificação de β-Lactamases

Para a maioria dos isolados bacterianos, a indicação da presença de ESBLs e carbapenemases estava presente nas fichas de dados cedidas pelo CHUC. Contudo, ao mesmo tempo que se realizava este estudo, decorria um estudo de caracterização molecular de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemos. Assim, para alguns isolados que revelaram produzir uma OXA-48-like, descrita pela primeira vez neste hospital (e raramente em Portugal) recorreu-se à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinar a presença de β-lactamases de acordo com as seguintes etapas:

1. Extração de DNA de três isolados clínicos – realizou-se uma suspensão com estas em 200 µl de água destilada estéril num tubo *Eppendorf* esterilizado de 1.5 ml. De

seguida recorreu-se a um vórtex para homogeneizar a suspensão que posteriormente foi colocada no aparelho *DryBlock Thermostat* aquecido a 100°C durante 15 minutos para que ocorresse a lise das bactérias. Por último, realizou-se uma centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto. Com este método, obteve-se o sobrenadante que continha o DNA de interesse e o depósito com os restantes constituintes bacterianos sem interesse para o estudo. Posto isto, o sobrenadante foi transferido para um novo *Eppendorf* e armazenado nas condições adequadas (-20°C) para posterior utilização;

2. Detecção de genes de β -lactamases e carbapenemases – realizou-se uma mistura para PCR com volume final de 50 μ l que incluiu: 25 μ l solução *Master Mix 2X* (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 21 μ l de *Water nuclease-free* (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal), 1 μ l de cada *primer* (*Foward e Reverse*) numa concentração de 10 μ M e 2 μ l de DNA. Para cada reação recorreu-se tanto a um controlo positivo (bactéria com o gene em pesquisa) como a um controlo negativo (água). Todas as amplificações de PCR foram realizadas no aparelho *T1 thermocycler Biometra* (Alfagene, Portugal). As condições de amplificação foram:

- gene *bla_{KPC}*: desnaturação inicial a 94°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, *annealling* a 62°C durante 45 segundos e extensão a 72°C durante 90 segundos e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos;
- gene *bla_{OXA-48}*: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 25 segundos, *annealling* 52°C durante 45 segundos e extensão 72°C durante 50 segundos e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos;
- genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealling* a 56°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

3. Eletroforese – após preparação do gel de agarose a 1% (0,4 g de agarose, 40 ml de tampão e 2 μ l de brometo de etídio), os produtos amplificados foram colocados nos poços do gel (2 μ l de azul de bromofenol com 8 μ l de amplicão) e procedeu-se á eletroforese durante 45 minutos. De seguida, o resultado foi visualizado sob luz UV e o tamanho dos amplicões foram confirmados por comparação com o peso molecular do DNA *ladder* 100bp (Thermo Scientific, BioPortugal, Portugal) e controlo positivo (Cantadeiro, 2018).

VI. Resultados e Discussão

Atualmente, infecções por organismos MDR adquiridos em ambiente hospitalar são um grande problema de saúde pública a nível global, uma vez que para além de criarem surtos, podem já ser considerados endémicos em muitos hospitais no sul da Europa. Um tratamento efetivo para estas infecções é um desafio para os profissionais de saúde e uma ferramenta importante para limitar a disseminação (Iacovelli *et al.*, 2018).

Klebsiella pneumoniae é a espécie do género *Klebsiella* com mais significado clínico, e uma das mais observadas entre os organismos oportunistas Gram-negativo (Li *et al.*, 2019). De facto, dos 100 isolados clínicos utilizados neste estudo, 94% correspondia a isolados *Klebsiella pneumoniae*, seguido de *Klebsiella oxytoca* (4%), *Serratia marcescens* (1%) e *Acinetobacter baumannii* (1%). Os 100 isolados pertenciam a 78 doentes diferentes, os quais apresentavam idades entre os 28 e os 89 anos (8 indivíduos não especificados), com 34 indivíduos do sexo feminino e 42 do sexo masculino (3 não especificados).

Klebsiella pneumoniae e *Klebsiella oxytoca* podem originar várias infecções incluindo do trato urinário, pneumonia adquirida na comunidade, bacteriemia e abscessos no fígado (Li *et al.*, 2019; Hackel *et al.*, 2016). Infecções complicadas intra-abdominais (cIAIs) e infecções complicadas do trato urinário (cUTIs) são infecções bacterianas comuns nos doentes hospitalizados causadas por *E. coli* e *Klebsiella spp.* (Mawal *et al.*, 2015). Pneumonia associada a ventilação mecânica (VAP) representa 80% das pneumonias adquiridas no hospital (HAP) (Liapikou e Torres, 2016). Como é possível perceber pela Figuras 8, a urina é a amostra clínica mais significativa (47%), seguida de exsudado (14%), aspirado brônquico (12%), expetoração (11%), sangue (9%), bÍlis (4%), abcesso (2%) e dreno (1%). De realçar na Figura 9, o serviço de Urgências (16,2%) como principal local onde se encontravam os pacientes com infecções provocadas pelos diferentes microrganismos, tornando-se num foco de entrada das bactérias no hospital e possível disseminação, não havendo as condições e cuidados associados adequados. Segue-se a presença de 13,1% dos isolados em neurocirurgia, 12,1% em medicina intensiva, 8,1% nas enfermarias de medicina interna e urologia, 7,1% em cirurgia e infectocontagiosas, 6,1% na Unidade de queimados, 4,0% em transplante hepático, 3,0% em hematologia, 2,0% em cardiologia, gastroenterologia e ortopedia, e por último, 1,0% na enfermaria de nefrologia.

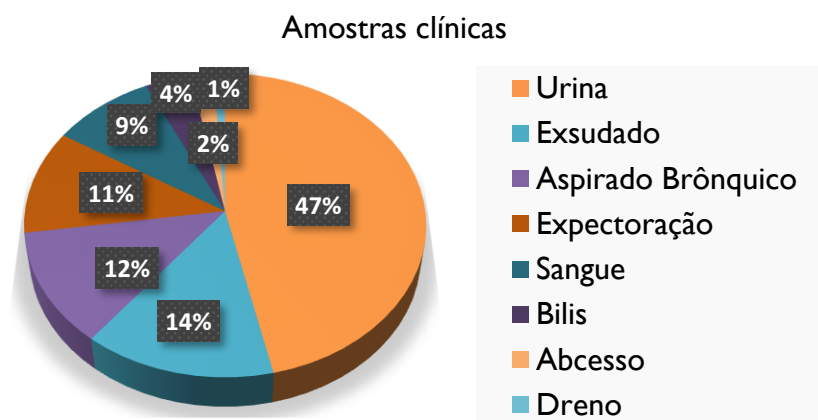


Figura 8 – Amostras biológicas dos isolados bacterianos, por ordem decrescente do número de amostras.

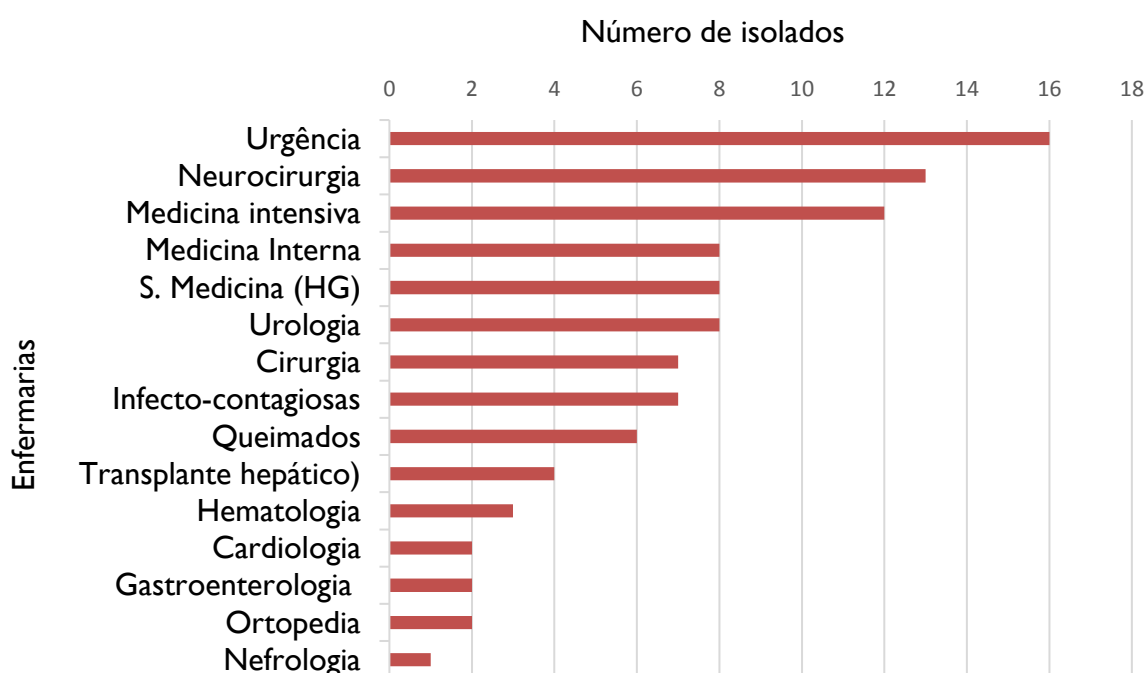


Figura 9 – Diferentes enfermarias nas quais foram recolhidos os isolados bacterianos, por ordem decrescente do número de isolados colhidos em cada enfermaria.

As β -lactamases tornaram-se numa grande ameaça à utilização de agentes antimicrobianos β -lactâmicos desde a introdução da penicilina (Bush, 2015). Infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e/ou carbapenemases representam uma parte significativa da resistência aos agentes antimicrobianos em bactérias Gram-negativas e a sua disseminação contribui para um aumento da morbidade e mortalidade (Abodakpi *et al.*, 2018).

O método de referência para identificar organismos produtores de ESBL é a identificação de genes ESBL através da técnica de PCR. No entanto, métodos fenotípicos são mais utilizados, como o teste de difusão de duplo disco, combinando uma

cefalosporina de terceira geração com ou sem ácido clavulânico (Arizpe *et al.*, 2016; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019). Atendendo aos resultados na ficha clínica dos isolados, 93 isolados eram produtores de carbapenemases, 3 isolados apresentavam tanto ESBL como carbapenemases e 4 não apresentavam nenhuma informação quanto à presença de mecanismos de resistência.

Os antibiogramas disponibilizados foram realizados no CHUC, obtidos a partir do sistema automatizado Vitek 2 Advanced Expert System - AES (BioMérieux, Portugal). A partir da análise dos resultados observou-se a existência de uma notória resistência a algumas classes de agentes antimicrobianos, como é possível verificar na Figura 10. Salvar que os agentes antimicrobianos utilizados não foram iguais em todos os isolados (cartas de Vitek diferentes), pelo que os resultados não são enquadrados nos 100 isolados. Todos os isolados analisados mostraram ser resistentes à combinação amoxicilina/ácido clavulânico. Já em relação às outras classes, as cefalosporinas e os carbapenemos foram as que mostraram uma frequência de resistência mais elevada. Por outro lado, os isolados mostraram-se bastante sensíveis à colistina e à tigeciclina.

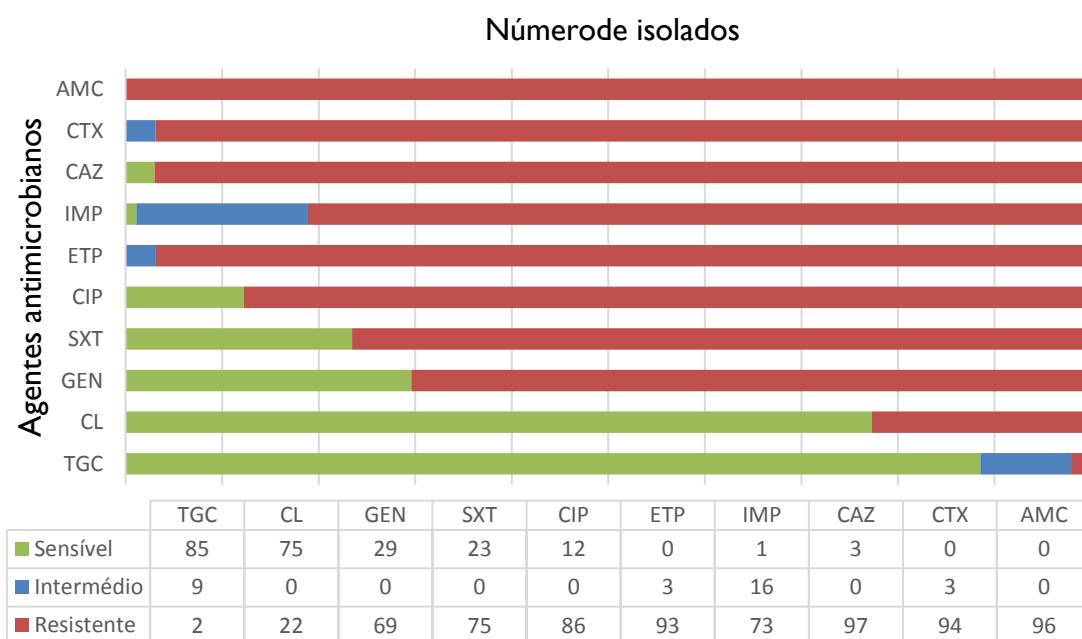


Figura 10 – Perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos dos 100 isolados de acordo com os resultados fornecidos pelo CHUC. AMC (amoxicilina e ácido clavulânico); CTX (cefotaxima); CAZ (ceftazidima); IMP (imipenemo); ETP (ertapenemo); CIP (ciprofloxacina); SXT (trimetoprim/sulfametoxazol); GEN (gentamicina); CL (colistina); TGC (tigeciclina).

Relativamente ao estudo realizado, o agente antimicrobiano em teste tratou-se de uma combinação de Ceftazidima-Avibactam, cujo agente antimicrobiano de comparação foi apenas Ceftazidima. No Anexo II estão descritos os valores dos *breakpoints*, em milímetros (mm), tanto para CAZ como CZA, segundo as normas EUCAST e CLSI (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019). A partir dos valores estabelecidos, foi possível determinar a suscetibilidade dos diferentes isolados estudados, ilustrados na Figura 11. Dos 100 isolados estudados, 97 apresentaram resistência a ceftazidima, 1 apresentou suscetibilidade intermédia e os 2 restantes apresentaram-se sensíveis a este agente antimicrobiano. Com a inclusão do avibactam à ceftazidima, assistimos a uma inversão dos valores, pelo que 97 dos isolados se mostraram suscetíveis à combinação ceftazidima-avibactam e 2 continuaram a mostrar-se resistentes. Para o isolado *A. baumannii* não se conseguiu concluir quanto à sua suscetibilidade à combinação CZA por não existirem valores estabelecidos.



Figura 11 – Perfil de suscetibilidade dos 100 isolados aos agentes antimicrobianos Ceftazidima (CAZ) vs Ceftazidima/Avibactam (CZA).

Com ceftazidima, os halos de inibição variaram entre os 0 e os 24 mm (Figura 12), enquanto que, como podemos observar pela Figura 13, com a adição do avibactam, o tamanho dos halos aumentou significativamente para valores compreendidos no intervalo 17-29 mm.

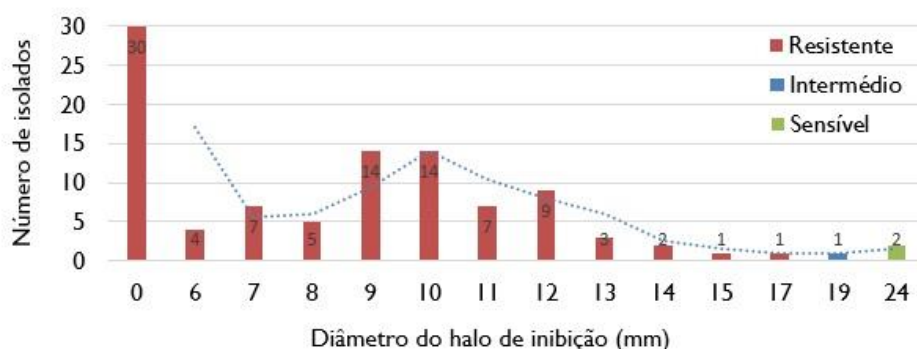


Figura 12 – Diâmetro dos halos de inibição dos antibiogramas com ceftazidima, em milímetros (mm).

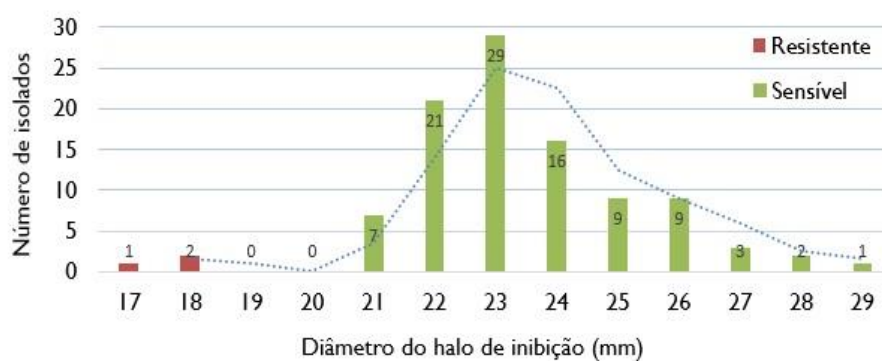


Figura 13 – Diâmetro dos halos de inibição dos antibiogramas com a combinação ceftazidima-avibactam, em milímetros (mm).

O isolado 5 trata-se de um isolado *Klebsiella pneumoniae* ST348 e de acordo com os resultados obtidos pela técnica PCR, apresenta as ESBLs SHV-11 e CTX-M-15, a penicilinase TEM-1 e carbapenemases OXA-181 e KPC-3 (Cantadeiro, 2018). Pelos dados fornecidos pelo CHUC, o isolado apenas se mostra sensível a amicacina e a colistina e com a realização do antibiograma (Figura 14-A), foi possível perceber que o isolado era bastante resistente à CAZ (halo de inibição = 0 mm). Contudo, com a adição do AVI, verificou-se uma diminuição significativa da resistência, apresentando um halo de inibição de 23 mm.

O isolado 7 – *Klebsiella pneumoniae* ST17 – também apresenta ESBLs e carbapenemases, SHV-11/CTX-M-15 e OXA-181, respetivamente. Embora não tenha sido possível aceder aos dados deste isolado, o antibiograma revelou halos de inibição de 12 mm para CAZ e de 26 mm para CZA (Figura 14-B).

Para o isolado 6 (*Klebsiella pneumoniae*), apenas foi possível detetar a presença de SHV-11 e OXA-181. O seu perfil de suscetibilidade mostrava ser sensível a gentamicina, amicacina e colistina, sendo intermédio para cefotaxima, meropenemo, cefepima e tigeciclina. Os halos de inibição apresentam halos de igual tamanho (24 mm) tanto para CAZ como para CZA (Figura 14-C).

De acordo com o resultado do isolado 6, as beta-lactamases SHV-11 e OXA-181 parecem não ter um papel fulcral na resistência à CAZ. Ceftazidima isolada tem capacidade de inibir estas ESBLs e a adição de avibactam, utilizando a combinação CZA, mostra não apresentar um poder de inibição de crescimento bacteriano superior. De facto, estudos apontam que a inclusão de β -lactamases como SHV-11 e SHV-12 parecem não afetar a suscetibilidade à combinação CZA (Manning *et al.*, 2017). OXA-181, uma carbapenemase OXA-48-like, tem a capacidade de hidrolisar carbapenemos, mas apresenta fraca atividade

contra cefalosporinas de espectro alargado, como a ceftazidima (Stewart *et al.*, 2018). De facto, estudos demonstram que CZA é bastante eficaz na inibição de OXA-181 (Jayol *et al.*, 2018).

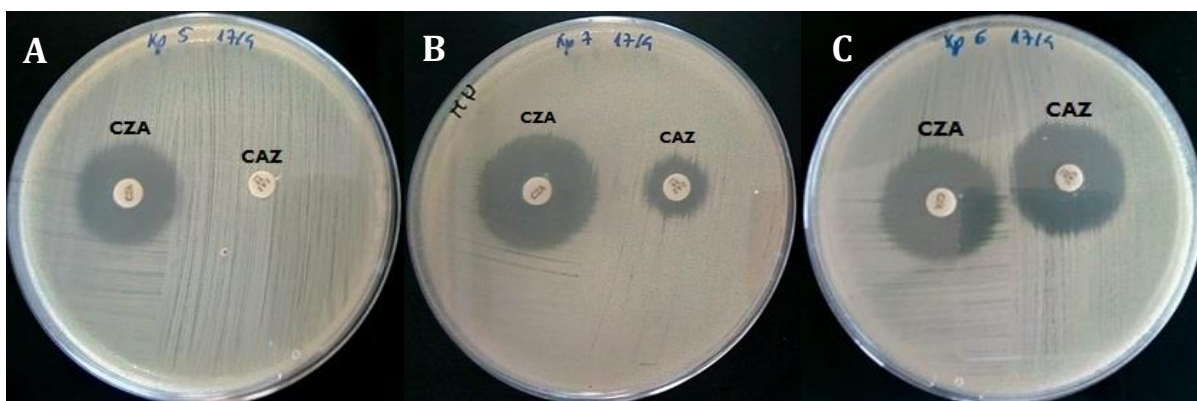


Figura 14 – Antibiogramas de isolados clínicos - *Klebsiella pneumoniae*. A) Isolado 5; B) Isolado 7; C) Isolado 6. CAZ (ceftazidima), CZA (ceftazidima/avibactam)

O desenvolvimento de inibidores das β -lactamases como o avibactam representa um passo muito importante no combate de bactérias Gram-negativas resistentes aos agentes antimicrobianos (Gardiner e Golan, 2016). A capacidade de avibactam inibir as β -lactamases KPC é de particular interesse tendo em conta a disseminação global destas (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; Livermore *et al.*, 2015) e a capacidade que apresentam de hidrolisar carbapenemos, cefalosporinas de espectro alargado e aztreonam (Humphries *et al.*, 2015). Em Portugal, há registo de *K. pneumoniae* ST348 produtora de KPC-3, uma estirpe incomum, no CHUC em 2013 (Vubil *et al.*, 2017). O registo deste novo isolado (isolado 5), em 2017, é uma preocupação na medida em que o doente pode ter entrado no hospital infetado ou, desde a sua descoberta, esta estirpe pode ter-se disseminado pelo CHUC infetando o doente durante a hospitalização. Neste estudo, KPC-3 mostrou-se suscetível à combinação ceftazidima-avibactam. No entanto, existem alguns casos reportados de resistência em isolados produtores de KPC-3 através de mutações no omega-loop (Asp179Tyr) (Bush, 2015). Esta mutação é bastante interessante, no sentido em que, apesar de conferir resistência a CZA, permite que se torne suscetível aos carbapenemos (Shields *et al.*, 2016; Bush, 2015; Shields *et al.*, 2017; Hemarajata e Humphries, 2019). Contudo, esta mutação é também bastante preocupante tendo em conta que o seu aparecimento surgiu durante o tratamento com ceftazidima-avibactam em 3 pacientes com VAP causada por *K. pneumoniae* ST258, a CRE mais difundida mundialmente (Shields *et al.*, 2017; (Gaibani *et al.*, 2018). É possível concluir que a combinação ceftazidima-avibactam exerce uma forte pressão seletiva que resulta

em mutações que tornam as CRE resistentes a esta combinação (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018; Giddins *et al.*, 2018).

O isolado 5, para além das ESBLs e KPC-3 apresenta também CTX-M-15 que parece ser suscetível à combinação CZA. De facto, estudos mostram que ceftazidima-avibactam é dos agentes mais ativos contra isolados que produzem esta β -lactamase (Castanheira *et al.*, 2015; Castanheira *et al.*, 2016). A penicilinase TEM-1 presente também parece ser inibida pela combinação CZA. A sua inibição pode dever-se à capacidade de avibactam estabelecer uma ligação covalente com esta β -lactamase, apresentando melhor atividade do que ácido clavulânico e tazobactam (Sgrignani *et al.*, 2014; Stachyra *et al.*, 2010).

Os dois isolados bacterianos que se mostraram resistentes a CZA são *Klebsiella oxytoca*, pertencem aos mesmo doente e foram isolados da urina. Segundo os dados disponíveis, o primeiro isolado era suscetível a trimetoprim/sulfametoxazol, colistina e tigleciclina, e apresentava suscetibilidade intermédia a imipenemo, ertapenemo e cefepima. O segundo isolado mantinha o mesmo perfil de suscetibilidade, exceto para colistina, ao qual se tornou resistente ao longo do tratamento. No antibiograma realizado, tanto o primeiro isolado como o segundo apresentaram halos de inibição de 12 mm para ceftazidima e de 18 mm para CZA. Segundo as orientações das normas CLSI em vigor em 2019, valores de inibição entre 18 e 20 mm podem tratar-se de falsas resistências, pelo que devem ser confirmados com avaliação da MIC. Também segundo a literatura, a realização da avaliação da suscetibilidade através do método *Etest* produziria resultados mais fiáveis do que com a utilização de discos de difusão (Shields *et al.*, 2018; Kresken e Körber-irrgang, 2018).

Entre *Klebsiella spp.*, *K. oxytoca* tem sido isolada mais frequentemente em diferentes amostras clínicas (sangue, pus e urina) (Singh, Cariappa e Kaur, 2016). Tendo em conta que *K. oxytoca* pertence à família *Enterobacteriaceae*, seria esperado que fosse suscetível à combinação ceftazidima-avibactam. O mecanismo de resistência não foi avaliado neste estudo. Na literatura, existe registo do gene *bla_{VIM-2}*, uma metalo- β -lactamases em *K. oxytoca* em Portugal (Conceição *et al.*, 2005), pelo que não seria inibida pela combinação CZA tendo em conta a sua incapacidade de inibir esta classe de β -lactamases. De facto, *K. oxytoca*, assim como outras *Enterobacteriaceae* que apresentam enzimas de classe B não são inibidas por CZA (Hackel *et al.*, 2016). Outro estudo com um isolado *K. oxytoca* produtora da beta-lactamase SHV-12 e da penicilinase TEM-1 mostrou-se resistente à combinação ceftazidima-avibactam. Este resultado não era o esperado tendo em conta que estas enzimas são suscetíveis à inibição pelo avibactam e o mecanismo de resistência

não foi determinado (Karlowsky *et al.*, 2016). Na Áustria, foi descrito um surto nosocomial de *K. oxytoca* produtoras de KPC (Hoenigl *et al.*, 2012). No caso do presente estudo, os isolados *K. oxytoca* podem ser produtores de KPC, pelo que a resistência poderia dever-se a mutações no gene *bla_{KPC}*. Apesar das possíveis resistências, estudos mostram que ceftazidima-avibactam apresenta boa capacidade de inibir *K. oxytoca* produtoras de ESBLs (Castanheira *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi utilizado um isolado *Acinetobacter baumannii*. Esta bactéria tem sido muito associada aos cuidados de saúde mundialmente nas últimas duas décadas, principalmente em pneumonia associada a ventilação mecânica, bacteriemia e infecções de feridas. No presente estudo, o isolado *Acinetobacter baumannii* apresentou um halo de inibição de 17 mm para CZA, não melhorando a atividade do agente antimicrobiano ceftazidima (halo de inibição com 19 mm) tal como esperado segundo o espectro de ação de CZA. De realçar que este isolado não se mostrou suscetível a nenhum agente antimicrobiano testado, incluindo colistina.

Em infecções por *A. baumannii* resistente a carbapenemos, o tratamento passa por colistina e tigeciclina, sozinhos ou em combinação (Lee e Doi, 2014). Estudos mostram que avibactam não melhora a atividade de ceftazidima contra estes isolados. No entanto, parece haver sinergia entre CZA e meropenemo no tratamento de isolados com genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-117}* (Gaudereto *et al.*, 2019). Um estudo mostrou também que a combinação de CZA com aztreonam apresenta sinergia contra isolados produtores de OXA-lactamases (Wenzler *et al.*, 2017).

Para o isolado *Serratia marcescens*, este era resistente a ceftazidima com um halo de inibição com 11 mm e a adição de avibactam aumentou a atividade, refletindo-se no halo de inibição com 26 mm. Na literatura, CZA em combinação com meropenemo também apresenta sinergia contra *S. marcescens* com o gene *bla_{KPC-2}* (Gaudereto *et al.*, 2019).

As polimixinas após os anos 70 caíram em desuso face aos seus efeitos nefro e neurotóxicos. Contudo, com a emergência de microrganismos multirresistentes nos últimos anos, a sua utilização aumentou. Como resultado, os casos de resistência também começaram a aumentar (Srinivas e Rivard, 2017; Ah, Kim e Lee, 2014). Casos de emergência de *K. pneumoniae* produtoras de KPC resistentes a colistina limita ainda mais as opções terapêuticas disponíveis para tratar infecções por estes organismos patogénicos (Bouchillon, Sahm e Bradford, 2016). Um estudo com 48 *K. pneumoniae* resistentes à colistina (produtoras de carbapenemases de classe A ou D) mostraram-se sensíveis à

combinação CZA (Jayol *et al.*, 2018). Ceftazidima-avibactam também já foi usada em combinação com ertapenemo para tratar um doente infetado por *K. pneumoniae* produtora de KPC que se tornou resistente a tigeciclina e colistina após o tratamento de infeções nosocomiais sucessivas (Bouchillon, Sahm e Bradford, 2016). Duin, Van *et al.* demonstrou ainda que a probabilidade de ter melhores resultados com a combinação ceftazidima-avibactam é de 64% comparado com a colistina (Duin, Van *et al.*, 2018). No presente estudo, 21 isolados mostraram-se resistentes à colistina, dos quais 20 isolados revelaram ser suscetíveis à combinação CZA. Desta forma, podemos inferir que ceftazidima-avibactam pode tornar-se numa opção de tratamento para combater infeções causadas por microrganismos resistentes à colistina.

Da mesma forma, um estudo demonstrou que CZA pode também ser uma alternativa ao tratamento de infeções causadas por bactérias resistentes a gentamicina (Denisuik *et al.*, 2015). O tratamento de uma bacteremia por CRE com CZA mostrou uma taxa de sucesso e sobrevivência superior ao uso de aminoglicosídeos ou colistina (Tuon, Rocha e Formigoni-Pinto, 2018).

As conclusões neste estudo apresentam algumas limitações. Primeiro, alguns isolados bacterianos pertencem ao mesmo doente, pelo que a probabilidade de apresentarem características idênticas é muito elevada. Segundo, os diferentes isolados não foram submetidos à mesma avaliação antimicrobiana, uma vez que os agentes antimicrobianos não foram iguais para todos os isolados bacterianos. Terceiro, a avaliação da suscetibilidade à combinação ceftazidima-avibactam não foi realizada segundo um método de referência e a resistência dos isolados *K. oxytoca* não foi confirmada como descrito pelas normas de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019) uma vez que a companhia farmacêutica apenas forneceu discos para uso em investigação. Quarto, o método utilizado pode estar sujeito a vários erros técnicos durante a manipulação tais como a distância entre os discos e erro na medição dos halos de inibição.

VII. Conclusão

A resistência antimicrobiana é uma situação preocupante e um grave problema de saúde pública. Mesmo com o aparecimento de novos agentes antimicrobianos, as bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a estes (como a resistência à combinação ceftazidima-avibactam através da produção de metalo-B-lactamases) ou podem adquirir a capacidade de se tornarem resistentes através da aquisição ou mutação de genes.

Este estudo permite concluir que, em Portugal, a resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na rotina clínica em meio hospitalar é muito elevada. Tendo em conta que as cefalosporinas de terceira geração e os carbapenemos são as últimas linhas de recurso ao tratamento das infeções provocadas por microrganismos multirresistente, o aparecimento da combinação ceftazidima-avibactam foi sem dúvida uma mais valia e um agente valioso a adicionar ao leque de possibilidades de tratamento destas infeções.

Apesar das limitações do estudo, os resultados indicam que a combinação ceftazidima-avibactam apresenta uma elevada capacidade de inibir bactérias produtoras de β -lactamases de largo espectro (ESBLs) e carbapenemases do tipo KPC, amplamente disseminadas.

O aparecimento de *Klebsiella oxytoca* não é muito comum, comparando com *Klebsiella pneumoniae*. À data e do meu conhecimento, este é o primeiro estudo que reporta dois isolados *K. oxytoca* resistentes à combinação ceftazidima-avibactam em Portugal. Contudo, o mecanismo de resistência não foi determinado.

O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e a implementação de condições e cuidados hospitalares são medidas necessárias para combater o aparecimento e a disseminação de bactérias multirresistentes emergentes.

Referências

1. ABODAKPI, Henrietta *et al.* - Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital. **Journal of Chemotherapy**. 30:2 (2018) 115–119.
2. AH, Young Mi; KIM, Ah Jung; LEE, Ju Yeun - Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 44:1 (2014) 8–15.
3. AITKEN, Samuel L. *et al.* - High Rates of Nonsusceptibility to Ceftazidime-avibactam and Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase Production in Enterobacteriaceae Bloodstream Infections at a Major Cancer Center. **Clinical Infectious Diseases**. 63:7 (2016) 954–958.
4. **AMI - Assistência Médica Internacional** - [Consult. 10 mar. 2019]. Disponível em <https://ami.org.pt/missao/reciclagem-de-radiografias/>
5. **APIFARMA** - [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em [https://www.apifarma.pt/Documentos/ENews/Apifarma_Deloitte_\(Des\)abastecimento_PR_20160630.pdf](https://www.apifarma.pt/Documentos/ENews/Apifarma_Deloitte_(Des)abastecimento_PR_20160630.pdf)
6. ARIZPE, Andre *et al.* - Updates in the Management of Cephalosporin-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Current Infectious Disease Reports**. 18:12 (2016).
7. ASLI, Abdelhamid *et al.* - Distinctive Binding of Avibactam to Penicillin-Binding Proteins of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 60:2 (2016) 752–756.
8. BARBER, Katie E. *et al.* - Ceftazidime/avibactam versus standard-of-care agents against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae harbouring blaKPC in a one-compartment pharmacokinetic/pharmacodynamic model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 73:9 (2018) 2405–2410.
9. BERKHOUT, Johanna *et al.* - In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam Combination in In Vitro Checkerboard Assays . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:2 (2015) 1138–1144.
10. BOTH, Anna *et al.* - Emergence of ceftazidime/avibactam non-susceptibility in an MDR *Klebsiella pneumoniae* isolate. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. 72:9 (2017) 2483–2488.
11. BOUCHILLON, Samuel K.; SAHM, Daniel F.; BRADFORD, A. - Global Dissemination of bla KPC into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro Susceptibility to Ceftazidime- Avibactam and Aztreonam-Avibactam. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy. 60:8 (2016) 4490–4500.

12. BROOKS, G. F. *et al.* - **Medical Microbiology**. ISBN 9788578110796.
13. BUSH, Karen - A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 46:5 (2015) 483–493.
14. CANTADEIRO, Cláudia - **Caracterização de Isolados Químicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemases e/ou resistentes à colistina.** [S.l.] : Universidade de Aveiro, 2018
15. CASTANHEIRA, Mariana *et al.* - Ceftazidime-avibactam activity tested against Enterobacteriaceae isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of β -lactamase-producing strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 59:6 (2015) 3509–3517.
16. CASTANHEIRA, Mariana *et al.* - Changes in the Frequencies of β -Lactamase Genes among Enterobacteriaceae Isolates in U.S. Hospitals, 2012 to 2014: Activity of Ceftazidime-Avibactam Tested against β -Lactamase-Producing Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 60:8 (2016) 4770–4777.
17. CDC - **Biggest Threats and Data** [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fthreat-report-2013%2Findex.html>.
18. CDC - **About Antimicrobial Resistance** [Consult. 2 mar. 2019]. Disponível em <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>>.
19. CHAHINE, Elias B.; SOURIAL, Mariette; ORTIZ, Raquel - Ceftazidime/avibactam: A new antibiotic for gram-negative infections. **Consultant Pharmacist.** 30:12 (2015) 695–705.
20. CHEN, Mengmeng *et al.* - Novel β -lactam/ β -lactamase inhibitors versus alternative antibiotics for the treatment of complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Expert Review of Anti-Infective Therapy.** 16:2 (2018) 111–120.
21. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - **CLSI M100-ED29:2019 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition** [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED29:2019&scope=user>>.
22. COLEMAN, Ken - Diazabicyclooctanes (DBOs): A potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. **Current Opinion in Microbiology.** 14:5 (2011) 550–555.

23. COMPAIN, Fabrice; ARTHUR, Michel - Impaired Inhibition by Avibactam and Resistance to the Ceftazidime-Avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61:7 (2017) 1–7.
24. COMPAIN, Fabrice; DORCHÈNE, Delphine; ARTHUR, Michel - Combination of Amino Acid Substitutions Leading to CTX-M- 15-Mediated Resistance to the Ceftazidime-Avibactam Combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 62:9 (2018) 1–8.
25. COMPAIN, Fabrice; DORCHÈNE, Delphine; ARTHUR, Michel - Combination of Amino Acid Substitutions Leading to CTX-M- 15-Mediated Resistance to the Ceftazidime-Avibactam Combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 62:9 (2018) 1–8.
26. CONCEIÇÃO, T. *et al.* - First isolation of blaVIM-2 in Klebsiella oxytoca clinical isolates from Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 49:1 (2005) 476.
27. DAVIDO, Benjamin *et al.* - Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam, an Interesting Strategy To Overcome B-Lactam Resistance Conferred by Metallo-B-Lactamases in Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. (2017) 1–3.
28. DENISUIK, Andrew J. *et al.* - In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against 338 Molecularly Characterized Gentamicin-Nonsusceptible Gram-Negative Clinical Isolates Obtained from Patients in Canadian Hospitals . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:6 (2015) 3623–3626.
29. DRAENERT, R. *et al.* - Novel antibiotics: Are we still in the pre–post-antibiotic era? **Infection**. 43:2 (2015) 145–151.
30. DUIN, David VAN *et al.* - Colistin Versus Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Infectious Diseases**. 66:2 (2018) 163–171.
31. DUIN, David VAN; BONOMO, Robert A. - Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**. 63:2 (2016) 234–241.
32. EHMANN, David E. *et al.* - Avibactam is a covalent, reversible, non-B-lactam B-lactamase inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109:29 (2012) 11663–11668.
33. EMERAUD, Cécile *et al.* - Aztreonam plus clavulanate, tazobactam, or avibactam for treatment of infections caused by metallo-lactamase-producing gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 63:5 (2019).

34. ETERNA DA COSTA, Marisa; MACHADO, Humberto S. - Evolution of Antimicrobial Resistance in Europe: A Factual Review. **Journal of Allergy & Therapy**. 08:01 (2017) 1–14.
35. **EUR-Lex** - [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083&from=PT>
36. EUROPEAN ANTIMICROBIAL; NETWORK, Resistance Surveillance - **Surveillance of antimicrobial resistance in Europe (2017)**. Disponível em <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2016>
37. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - Emergence of resistance to ceftazidime-avibactam in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. June (2018).
38. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. (2019) 0–99.
39. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO. Anexo I (2016) 1–29.
40. FRAILE-RIBOT, Pablo A. *et al.* - In Vivo Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin–B-Lactamase Inhibitor Combinations through the Duplication of Amino Acid D149 from OXA-2 B-Lactamase (OXA-539) in Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61:9 (2017) 1–5.
41. GAIBANI, Paolo *et al.* - In vivo evolution of resistant subpopulations of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* during ceftazidime/avibactam treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 73:6 (2018) 1525–1529.
42. GALANI, I. *et al.* - Genomic characterization of a KPC-23-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. **Clinical Microbiology and Infection**. 25:6 (2019) 763.e5-763.e8.
43. GARDINER, Bradley J.; GOLAN, Yoav - Ceftazidime-avibactam (CTZ-AVI) as a treatment for hospitalized adult patients with complicated intra-abdominal infections. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 14:5 (2016) 451–463.
44. GAUDERETO, Juliana Januário *et al.* - Synergy effect of Ceftazidime-Avibactam with Meropenem against pan- resistant *Acinetobacter baumannii* and *Serratia marcescens* harboring carbapenemases: time-kill and disk approximation assays. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 63:5 (2019) 1–17.
45. GIDDINS, Marla J. *et al.* - Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam

Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 62:3 (2018) 1–8.

46. GUIMARÃES, Serafim; MOURA, Daniel; SOARES DA SILVA, Patrício - **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas**. 6ª edição ed. [S.l.] : Porto Editora, 2014. ISBN 978-972-0-01794-9.

47. HACKEL, Meredith *et al.* - Assessment of the In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Multidrug-Resistant *Klebsiella* spp. Collected in the INFORM Global Surveillance Study, 2012 to 2014 . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 60:8 (2016) 4677–4683.

48. HEMARAJATA, Peera; HUMPHRIES, Romney M. - Ceftazidime/avibactam resistance associated with L169P mutation in the omega loop of KPC-2. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 74:5 (2019) 1241–1243.

49. HIDALGO, Jose A.; VINLUAN, Celeste M.; ANTONY, Nishaal - Ceftazidime/avibactam: A novel cephalosporin/nonbeta-lactam beta-lactamase inhibitor for the treatment of complicated urinary tract infections and complicated intra-abdominal infections. **Drug Design, Development and Therapy**. 10:2016) 2379–2386.

50. HOBSON, Claire Amaris *et al.* - Successful treatment of bacteremia due to NDM-1-producing *Morganella morganii* with aztreonam and ceftazidime-avibactam combination in a pediatric patient with hematologic malignancy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 63:2 (2019).

51. HOENIGL, Martin *et al.* - Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 56:4 (2012) 2158–2161.

52. HUMPHRIES, Romney M. *et al.* - First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:10 (2015) 6605–6607.

53. IACOVELLI, Alessandra *et al.* - A challenging case of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* septic thrombophlebitis and right mural endocarditis successfully treated with ceftazidime/avibactam. **Infection**. 46:5 (2018) 721–724.

54. JAYOL, Aurélie *et al.* - Ceftazidime/avibactam alone or in combination with aztreonam against colistin-resistant and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. 73:2 (2018) 542–544.

55. JEON, Jeong Ho *et al.* - Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of

carbapenemases conferring antibiotic resistance. **International Journal of Molecular Sciences**. 16:5 (2015) 9654–9692.

56. KALIL, Andre C.; KLOMPAS, Michael - Ceftazidime-avibactam versus meropenem for the treatment of nosocomial pneumonia. **The Lancet Infectious Diseases**. 18:3 (2017) 229–231.

57. KARLOWSKY, James A. *et al.* - Activity of Ceftazidime-Avibactam against Extended-Spectrum- and AmpC B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Collected in the INFORM Global Surveillance Study from 2012 to 2014. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 60:5 (2016) 2849–2857.

58. KEEPERS, Tiffany R. *et al.* - Bactericidal Activity, Absence of Serum Effect, and Time-Kill Kinetics of Ceftazidime-Avibactam against β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 58:9 (2014) 5297–5305.

59. KERN, Winfried V. - Antibacterial agents. **Infections in Hematology**. (2015) 229–258.

60. KRESKEN, Michael; KÖRBER-IRRGANG, Barbara - Performance of the Etest for Susceptibility Testing of Enterobacterales (Enterobacteriaceae) and *Pseudomonas aeruginosa* toward Ceftazidime-Avibactam. **Journal of Clinical Microbiology**. 56:9 (2018) 1–3.

61. LAGACÉ-WIENS, P.; WALKTY, A.; KARLOWSKY, J. A. - Ceftazidime-avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. **Core Evidence**. 9:1555–1741 (2014) 13–25.

62. LEE, Chang Seop; DOI, Yohei - Therapy of infections due to carbapenem-resistant gram-negative pathogens. **Infection and Chemotherapy**. 46:3 (2014) 149–164.

63. LEVASSEUR, Premavathy *et al.* - Efficacy of a Ceftazidime-Avibactam Combination in a Murine Model of Septicemia Caused by Enterobacteriaceae Species Producing AmpC or Extended-Spectrum β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 58:11 (2014) 6490–6495.

64. LI, Henry *et al.* - In Vitro Susceptibility of Characterized β -Lactamase-Producing Strains Tested with Avibactam Combinations . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:3 (2015) 1789–1793.

65. LI, Ling *et al.* - The Genetic Structures of an Extensively Drug Resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* and Its Plasmids. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 8:January (2019) 1–11.

66. LIAPIKOU, Adamantia; TORRES, Antoni - Emerging drugs for nosocomial pneumonia. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. 21:3 (2016) 331–341.
67. LIVERMORE, David M. *et al.* - In Vitro Selection of Ceftazidime-Avibactam Resistance in Enterobacteriaceae with KPC-3 Carbapenemase . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:9 (2015) 5324–5330.
68. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, Inmaculada *et al.* - Activity of ceftazidime–avibactam against multidrug-resistance Enterobacteriaceae expressing combined mechanisms of resistance. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. 35:8 (2017) 499–504.
69. LOS-ARCOS, Ibai *et al.* - Lung transplantation in two cystic fibrosis patients infected with previously pandrug-resistant Burkholderia cepacia complex treated with ceftazidime–avibactam. **Infection**. 47:2 (2019) 289–292.
70. MACVANE, Shawn H. *et al.* - In vivo efficacy of humanized exposures of ceftazidime-avibactam in comparison with ceftazidime against contemporary Enterobacteriaceae isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 58:11 (2014) 6913–6919.
71. MAGIORAKOS, Anna Pelagia *et al.* - The rise of carbapenem resistance in Europe: Just the tip of the iceberg. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. 2:1 (2013) 2–4.
72. MANAGEIRO, Vera *et al.* - Predominance of KPC-3 in a survey for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:6 (2015) 3588–3592.
73. MANNING, Nyla *et al.* - Activity of Ceftazidime–Avibactam Against Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* , Including KPC-Carrying Isolates, Endemic to New York City . **Microbial Drug Resistance**. 24:1 (2017) 35–39.
74. MARSHALL, Steven *et al.* - Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome β -Lactam Resistance Conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61:4 (2017) 1–9.
75. MAWAL, Yogesh *et al.* - Ceftazidime-avibactam for the treatment of complicated urinary tract infections and complicated intra-abdominal infections. **Expert Review of Clinical Pharmacology**. 8:6 (2015) 691–707.
76. MAZUSKI, John E. *et al.* - Efficacy and safety of ceftazidime-avibactam plus metronidazole versus meropenem in the treatment of complicated intra-abdominal infection: Results from a randomized, controlled, double-blind, phase 3 program. **Clinical Infectious Diseases**. 62:11 (2016) 1380–1389.
77. MEHTA, Monica; UHLEMANN, Anne-Catrin - Beware of broad-spectrum

generalizations: ceftazidime-avibactam compared to meropenem for the treatment of gram-negative pneumonia. **Journal of Emergency and Critical Care Medicine**. (2018) 45–45.

78. MELANDER, Roberta J.; MELANDER, Christian - The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance: An Adjuvant Approach? **ACS Infectious Diseases**. 3:8 (2017) 559–563.

79. MELETIS, Georgios - Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**. 3:1 (2016) 15–21.

80. MISCHNIK, Alexander *et al.* - Susceptibility to cephalosporin combinations and aztreonam/avibactam among third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae recovered on hospital admission. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 49:2 (2017) 239–242.

81. MO, Yoonsun *et al.* - What's new in the treatment of multidrug-resistant gram-negative infections? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 93:2 (2019) 171–181.

82. MONOGUE, M. L. *et al.* - In Vitro Discordance with In Vivo Activity: Humanized Exposures of Ceftazidime-Avibactam, Aztreonam, and Tigecycline Alone and in Combination against New Delhi Metallo-B-Lactamase- Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Lung Infection Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61:7 (2017) 5–10.

83. NOVAIS, Â. *et al.* - Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and clones. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 31:11 (2012) 3057–3063.

84. **Ordem dos Farmacêuticos** - [Consult. 12 jun. 2019]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>>.

85. **Ordem dos Farmacêuticos** - [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/a-ordem-dos-farmaceuticos/regulamentos/>>.

86. PAPP-WALLACE, Krisztina M. *et al.* - Ceftazidime-Avibactam in Combination With Fosfomycin: A Novel Therapeutic Strategy Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Infectious Diseases**. 44106:October 2018 (2019) 1–10.

87. PAPP-WALLACE, Krisztina M.; BONOMO, Robert A. - New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. **Infectious Disease Clinics of North America**. 30:2 (2016) 441–464.

88. PETCHIAPPAN, Anushya; CHATTERJI, Dipankar - Antibiotic resistance: Current perspectives. **ACS Omega**. 2:10 (2017) 7400–7409.
89. POTTER, Robert F. *et al.* - The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Drug resistance update**. (2016) 30–46.
90. PRESTINACI, Francesca; PEZZOTTI, Patrizio; PANTOSTI, Annalisa - Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**. 109:7 (2015) 309–318.
91. PROGRAMA DE PREVENÇÃO E CONTROLO DE INFEÇÕES E DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS - PREVENÇÃO DA TRANSMISSÃO DE ENTEROBACTERIÁCEAS RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS EM HOSPITAIS DE CUIDADOS DE AGUDOS. (2017).
92. RÄISÄNEN, Kati *et al.* - Emergence of ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* during treatment, Finland, December 2018. **Eurosurveillance**. 24:19 (2019) 1–3.
93. RASHID, Mamun Ur *et al.* - Ecological effect of ceftazidime/avibactam on the normal human intestinal microbiota. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 46:1 (2015) 60–65.
94. RODRIGUES, Carla *et al.* - KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**. 7:JUN (2016).
95. SADER, Helio S. *et al.* - Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against gram-negative organisms collected from U.S. medical centers in 2012. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 58:3 (2014) 1684–1692.
96. SADER, Helio S. *et al.* - Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from U.S. Medical Centers, 2013 to 2016. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61:11 (2017) 1–11.
97. SADER, Helio S. *et al.* - Antimicrobial Activity of Ceftazidime- Avibactam Tested against Multidrug- Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from U.S. Medical Centers, 2013 to 2016. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 61:11 (2017).
98. SGRIGNANI, Jacopo *et al.* - Inactivation of TEM-1 by avibactam (NXL-104): Insights from quantum mechanics/molecular mechanics metadynamics simulations. **Biochemistry**. 53:31 (2014) 5174–5185.
99. SHAIKH, Sibhghatulla *et al.* - Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**.

22:1 (2015) 90–101.

100. SHANMUGAM, Priyadarshini; MEENAKSHISUNDARAM, Jeya; JAYARAMAN, Perumal - blaKPC gene detection in clinical isolates of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 7:12 (2013) 2736–2738.

101. SHEN, Zhen *et al.* - High ceftazidime hydrolysis activity and porin OmpK35 deficiency contribute to the decreased susceptibility to ceftazidime/avibactam in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 72:7 (2017) 1930–1936.

102. SHERRY, Norelle; HOWDEN, Benjamin - Emerging Gram negative resistance to last-line antimicrobial agents fosfomycin, colistin and ceftazidime-avibactam – epidemiology, laboratory detection and treatment implications. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. (2018) 1–18.

103. SHEU, Chau Chyun *et al.* - Management of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: current evidence and future prospects. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. 16:3 (2018) 205–218.

104. SHIELDS, RK *et al.* - Verification of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility Testing Methods against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**. 56:2 (2018) 1–7.

105. SHIELDS, Ryan K. *et al.* - Effects of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Subtypes, Extended-Spectrum β -Lactamases, and Porin Mutations on the In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:9 (2015) 5793–5797.

106. SHIELDS, Ryan K. *et al.* - Clinical Outcomes, Drug Toxicity, and Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Among Patients Treated for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**. 63:12 (2016) 1615–1618.

107. SHIELDS, Ryan K. *et al.* - Emergence of ceftazidime-avibactam resistance and restoration of carbapenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: A case report and review of literature. **Open Forum Infectious Diseases**. 4:3 (2017) 1–4.

108. SHIELDS, Ryan K. *et al.* - Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant

- Klebsiella pneumoniae Infections. **Antimicrob Agents Chemother.** 61:3 (2017) 1–11.
109. SHIRLEY, Matt - Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. **Drugs.** 78:6 (2018) 675–692.
110. SINGH, Lavan; CARIAPPA, M. P.; KAUR, Mandeep - Klebsiella oxytoca: An emerging pathogen? **Medical Journal Armed Forces India.** 72:2016) S59–S61.
111. **SNS - Serviço Nacional de Saúde** - [Consult. 10 mar. 2019]. Disponível em <https://www.inem.pt/2018/12/05/comemoracao-dos-25-anos-do-programa-troca-de-seringas/>>.
112. **SPMS - Serviços Partilhados do Ministério da Saúde** - [Consult. 10 mar. 2019]. Disponível em <https://spms.min-saude.pt/servicos-partilhados-de-saude>>.
113. **SPMS - Serviços Partilhados do Ministério da Saúde** - [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em <https://spms.min-saude.pt/wp-content/uploads/2019/01/FAQs-PEM-Receita-sem-papel-1.pdf>>.
114. SRINIVAS, Pavithra; RIVARD, Kaitlyn - Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. **Current Infectious Disease Reports.** 19:11 (2017) 7–9.
115. STACHYRA, Thérèse *et al.* - Mechanistic studies of the inactivation of TEM-1 and P99 by NXL104, a novel non- β -lactam β -lactamase inhibitor. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 54:12 (2010) 5132–5138.
116. STEWART, Adam *et al.* - Treatment of Infections by OXA-48-Producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 62:11 (2018).
117. SUTARIA, Dhruvitkumar S. *et al.* - First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of B- Lactams and B-Lactamase Inhibitors in Klebsiella pneumoniae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 62:6 (2018) 1–12.
118. TAMMA, Pranita D. *et al.* - Successful Treatment of Persistent Burkholderia cepacia Complex Bacteremia with Ceftazidime-Avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 62:4 (2018) e02213-17.
119. THADEN, Joshua T.; POGUE, Jason M.; KAYE, Keith S. - Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Virulence.** 8:4 (2017) 403–416.
120. TORRES, Antoni *et al.* - Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. **The Lancet Infectious Diseases.** 18:3 (2018) 285–295.
121. TUON, Felipe Francisco; ROCHA, Jaime L.; FORMIGONI-PINTO, Marcelo R. -

Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime–avibactam: a systematic review. **Infection**. 46:2 (2018) 165–181.

122. **Valor do Farmacêutico** - [Consult. 10 mar. 2019]. Disponível em <http://www.valordofarmaceutico.com/#section4>>.

123. **Valor do Farmacêutico** - [Consult. 10 mar. 2019]. Disponível em <http://www.valordofarmaceutico.com/#section1>>.

124. **VALORMED** - [Consult. 13 jun. 2019]. Disponível em <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>>.

125. **VALORMED** - [Consult. 13 jun. 2019]. Disponível em <http://www.valormed.pt/article/view/135/novos-ecomed>>.

126. VUBIL, D. *et al.* - Outbreak of KPC-3-producing ST15 and ST348 *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese hospital. **Epidemiology and Infection**. 145:3 (2017) 595–599.

127. WENZLER, Eric *et al.* - Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- β -lactamase-producing gram-negative pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 88:4 (2017) 352–354.

128. WHO - **Antimicrobial resistance** - [Consult. 2 mar. 2019]. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>.

129. WHO - **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics** - [Consult. 8 jun. 2019]. Disponível em <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>>.

130. WINKLER, Marisa L. *et al.* - Avibactam and Inhibitor-Resistant SHV β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:7 (2015) 3700–3709.

131. WINKLER, Marisa L. *et al.* - Unexpected challenges in treating multidrug-resistant gram-negative bacteria: Resistance to ceftazidime-avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 59:2 (2015) 1020–1029.

132. WINKLER, Marisa L.; PAPP-WALLACE, Krisztina M.; BONOMO, Robert A. - Activity of ceftazidime/avibactam against isogenic strains of *Escherichia coli* containing KPC and SHV β -lactamases with single amino acid substitutions in the Ω -loop. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 70:8 (2015) 2279–2286.

133. WRIGHT, Gerard D. - Q & A : Antibiotic resistance : where does it come from and what can we do about it ? **BMC Biology**. (2010).

134. YIGIT, Hesna *et al.* - Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing B-Lactamase KPC-2. **Society**. 47:12 (2003) 3881–3889.
135. ZAMAN, Sojib Bin *et al.* - A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**. 9:6 (2017).
136. ZHANG, Wenxia *et al.* - In vitro and in vivo bactericidal activity of ceftazidime-avibactam against Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**. 7:1 (2018) 1–9.

Anexos

Anexo I – Formações realizadas ao longo do estágio curricular

Dia	Tema
23 de janeiro	“O posicionamento da Farmácia na prestação dos cuidados de saúde em Portugal”
29 de janeiro	“Futuro da Saúde Respiratória em Portugal: o papel da Farmácia. Intervenção da Farmácia na Saúde Respiratória dos Utentes”
7 de fevereiro	Lançamentos Phyto, Lierac e Jowaé
15 de fevereiro	Formação Geral VICHY
27 de fevereiro	Suplementos Alimentares – BioActivo
15 de março	Formação Geral La Roche Posay
25 de março	Alergia Ocular – Optrex
26 de março	Curso Geral ISDIN
2 de abril	Formação Menarini – Abordagem dos temas: dor, hematomas e contusões, HBP, suplementos (energia), afeções otológicas, doença hemorroidária
8 de abril	Grande Academia de Formação Técnica LIERAC
4 de junho	Viver com Diabetes – autovigilância da diabetes na farmácia

Anexo II – Breakpoints de inibição para Ceftazidima e Ceftazidima-Avibactam (Adaptado de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019 e Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019)

	EUCAST				CLSI				
	CAZ/AVI 10/4 µg		CAZ 10 µg		CAZ/AVI 30/20 µg		CAZ 30 µg		
	Halo de inibição (mm)				Halo de inibição (mm)				
	S	R	S	R	S	R	S	I	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	=13	<13	=22	<19	=21	=20	=21	18 - 20	=17
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	-	-	=18	15 - 17	=14