



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SCREENING DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS DA ÁREA DA SAÚDE

Trabalho submetido por
Beatriz Meliço
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêutica

novembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SCREENING DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE CARBAPENEMOS EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS DA ÁREA DA SAÚDE

Trabalho submetido por

Beatriz Meliço

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva

e coorientado por

Prof. Doutora Maria Helena Barroso

novembro de 2021

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer às professoras que me orientaram, à Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva, a minha orientadora e à Prof. Doutora Maria Helena Barroso, a minha coorientadora, pela disponibilidade, apoio e compressão ao longo do trabalho. Foi difícil para todas devido aos imprevistos e a todo o trabalho que as professoras já têm diariamente. Agradeço por, no tempo que foi possível, terem conseguido direcionado a atenção para este projeto.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e pelo apoio financeiro necessário à realização do projeto.

Muito obrigada à Susana, à Natacha e à D^a Florinda pela disponibilidade e ajuda. Por terem acompanhado de perto, mesmo quando os resultados não estavam a ser os esperados sempre me motivaram.

A toda a equipa da farmácia Sousa Marques, por me permitir ter um horário favorável para conseguir continuar a trabalhar neste projeto e pelo apoio.

À minha família, em especial aos meus pais e avó, que suportaram todo os meus medos ao longo do meu percurso académico e que sempre acreditaram em mim mesmo quando duvidava de mim mesma.

Aos meus amigos e colegas, em particular à Ana Costa e à Daniela Paixão, pois foram a fonte principal da minha força durante estes anos de curso, pela amizade, ajuda, paciência e alegrias compartilhadas também ao longo deste projeto.

Resumo

Enquadramento: As multirresistências apresentadas pelas bactérias são uma grande preocupação a nível mundial. De entre essas bactérias destacam-se as Enterobactérias resistentes ao carbapenemos (CRE), uma vez que esta classe de antibióticos é uma das últimas linhas de tratamento. Estas bactérias são a causa de diversas infeções quer a nível hospitalar quer na comunidade. Apesar das enterobactérias, normalmente poderem ser encontradas no intestino, há estudos que registam a colonização nasal, no entanto ainda há poucos estudos neste sentido. Por estes motivos, é importante a realização de estudos de monitorização para identificação destas estirpes resistentes em zaragatoas nasais na comunidade.

Objetivo: Este trabalho tem como objetivo identificar a prevalência de CRE na comunidade a partir de zaragatoas nasais.

Métodos: O crescimento das amostras foi realizado a partir de um caldo de BHI. Para seleção de enterobactérias foram inoculadas as amostras em meio MacConkey. De modo a identificar as bactérias e a resistência aos carbapenemos foi utilizado o meio cromogénico SUPERCARBA e um teste de suscetibilidade aos antibióticos com carbapenemos.

Resultados: Foram usadas 908 amostras; destas apenas 103 apresentaram crescimento em BHI e 6 foram identificadas como sendo enterobactérias (5,8%). Todas apresentaram resultado positivo para CRE no meio SUPERCARBA. Para confirmar, foi realizado um antibiograma com três carbapenemos diferentes onde todas as amostras obtiveram o resultado sensível.

Conclusão: Foi confirmada a colonização nasal por enterobactérias na comunidade, em concreto em estudantes da área da saúde - Medicina Dentária. No entanto, devido aos resultados díspares na identificação de CRE, recomenda-se a realização de mais estudos para esclarecimento dos resultados.

Palavras-chave: Enterobactérias, Resistência, Carbapenemos, portadores nasais

Abstract

Background: Multidrug resistant bacteria is a major concern worldwide. Carbapenem resistant enterobacteria (CRE), are the ones that stand out the most. This class of antibiotics is the last lines of treatment. These bacteria are the cause of several influences both in the hospital and in the community. Although enterobacteria can normally be found in the intestine, there are studies that register nasal colonization, however there are still few studies in this regard. For these reasons, it is important to carry out monitoring studies to identify these resistant strains in nasal swabs in the community.

Objective: This work aims to identify a prevalence of SRC in the community from nasal swabs.

Methods: Foundation growth was performed using a BHI broth. For selection of enterobacteria they were inoculated by MacConkey medium. In order to identify bacteria and resistance to carbapenems, SUPERCARBA chromogenic medium and an antibiotic susceptibility test with carbapenems were used.

Results: 908 were used; these only 103 generations of growth in BHI and 6 were identified as being enterobacteria (5.8%). All positive results for CRE in the SUPERCARBA medium. To confirm, an antibiogram was performed with three different carbapenems where all those administered had a sensitive result.

Conclusion: Nasal colonization by enterobacteria in the community was confirmed, specifically in students in the health area - Dental Medicine. However, due to the disparate results in identifying SRC, further studies are recommended to clarify the results.

Keywords: Enterobacteria, Resistance, Carbapenems, nasal carriers

Índice

Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas.....	9
Siglas	11
1. Introdução.....	13
2. Características Principais das Enterobactérias	15
2.1. Estrutura das Enterobactérias.....	16
3. Infecções clínicas	17
4. Resistências aos Antibióticos	19
4.1. Antibióticos β -lactâmicos	20
4.1.1. Resistência a antibióticos β -lactâmicos	20
4.2. Carbapenemos.....	21
4.2.1. Resistência aos carbapenemos.....	23
5. Epidemiologia:	25
5.1. Prevalência:.....	27
6. CRE associadas a cuidados de saúde	27
7. CRE associadas à comunidade.....	29
8. Surgimento de CRE em zangatoas nasais	31
9. Objetivo.....	33
10. Materiais e Métodos.....	35
10.2. Metodologia	35
10.3. Enriquecimento	35
10.4. Isolamento de Enterobactérias	36
10.5. Identificação de CRE	36
10.6. Teste de Resistência a Antibióticos	37
11. Resultados	39
12. Discussão de Resultados:	43

13. Conclusão:.....	45
Referências Bibliográficas.....	47
Anexos	
Anexo I. Instruções sobre meio SuperCARBA	

Índice de Figuras

1. Figura 1. Coloração de Gram de bactérias Gram-negativo	13
2. Figura 2. Esquema da Família <i>Enterobacteriaceae</i>	15
3. Figura 3. Parede celular de bactérias Gram-negativo	16
4. Figura 4. Estrutura molecular de antibióticos β -lactâmicos	20
5. Figura 5. Evolução da estrutura molecular de alguns carbapenemos	23
6. Figura 6. Distribuição mundial de CRE	25
7. Figura 7. Comparação das fases epidemiológicas de Enterobactérias produtoras de carbapenemase em países europeus entre 2010 e 2018	26
8. Figura 8. Incidência de CRE em 10,000 doentes por dia entre 2011 e 2017	27
9. Figura 9. Identificação do tipo de enterobactéria pela coloração do meio SuperCARBA	36
10. Figura 10. Crescimento em caldo de BHI	39
11. Figura 11. Crescimento das amostras em meio MacConkey	39
12. Figura 12. Crescimento das amostras no meio cromogénico SuperCARBA	40
13. Figura 13. Exemplo de placa com um TSA com carbapenemos de uma das amostras	41

Índice de Tabelas

1.	Tabela 1. Caracterização da população das amostras com enterobactérias	40
2.	Tabela 2. Resultados dos Antibiógramas realizados	41

Siglas

BHI – *Brain Heart Infusion*

CP-CRE – Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos produtoras de carbapenemase

CRE – Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos

CRE-HAI – infecções por Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos associadas a cuidados de saúde

DHP-I - Desidropeptidase I

EMG – Elemento genético móvel

HAI – infecções associadas a cuidados de saúde

IMP – Imipenemase

KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS - Lipopolissacárido

MDR - Multirresistências a antibióticos

MIMD – Mestrado Integrado em Medicina Dentária

MLST - *Multilocus sequence typing*

NDM – New Delhi Metallo- β -lactamase

OXA – Oxacilinase

OXA - 48 – Oxacilinase 48

PBP – Proteínas de ligação à penicilina

TSA - Testes de sensibilidade aos antibióticos

VIM – Metallo- β -lactamase codificado por Integron Verona

1. Introdução

As bactérias foram as primeiras formas de vida na Terra. Devido à sua enorme capacidade de adaptação, foram sofrendo alterações que lhes permitem, ainda hoje, sobreviver e multiplicar em diversas condições adversas que a natureza e o Homem lhes conferem, nomeadamente na presença de antibióticos (KASVI, 2019).

A resistência aos antibióticos é um tema preocupante em todo o mundo, sendo um grave problema de saúde pública (Calisto, 2011)

Apesar de existirem diversas resistências por parte das mais diversas bactérias, no que diz respeito a infeções nosocomiais ou adquiridas na comunidade, a família *Enterobacteriaceae* é uma das quais onde a resistência é mais prevalente (KASVI, 2019).

Esta família, *Enterobacteriaceae*, é constituída por bacilos Gram-negativo (figura1), classificadas como anaeróbias facultativas, uma vez que são capazes de se desenvolver em ambientes aeróbios e anaeróbios (KASVI, 2019). A maioria das espécies possui flagelação peritrica, permitindo motilidade, como é o caso de *Escherichia coli* (*E. coli*) (KASVI, 2019) (Calisto, 2011)(Armand-Lefèvre et al., 2013).

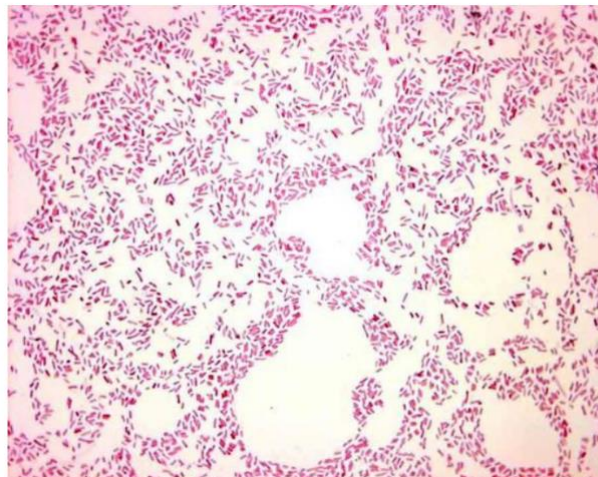


Figura 1: Coloração de Gram de bactérias Gram-negativo (Retirado: (KASVI, 2019))

A designação enterobactéria é em homenagem ao habitat predominante destes microrganismos, os intestinos dos animais (do grego enteron), sendo que além de poderem fazer parte da flora natural dos mesmos, por serem bactérias oportunistas, estas bactérias podem causar infeções sistémicas, urinárias, entéricas e do trato respiratório inferior (Farmacêuticos, 2018).

2. Características Principais das Enterobactérias

Estas bactérias medem em média 1 a 5 µm e são também caracterizadas por serem catalase positiva (a enzima catalase converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, sendo possível observar bolhas) e oxidase negativa, à exceção da *Plesiomonas shigelloides* que é oxidase positiva (a enzima oxidase desenvolve uma cascata de oxidação até formar um composto púrpura) (Bbl et al., 2018)(Atanasova, 2010)(Beveridge, 1999).

Também são capazes de reduzir nitratos em nitritos e fermentar glucose resultando na produção de ácidos e gás. Crescem em meios com peptona, extrato de carne e geralmente em meio MacConkey, sendo a sua temperatura de crescimento é entre 22 a 35°C (Atanasova, 2010)(Beveridge, 1999).

Em 2014 já tinham sido identificadas mais de 210 espécies e 53 géneros de enterobactérias (KASVI, 2019)(Calisto, 2011). Estas pertencem ao domínio *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales* e família *Enterobacteriaceae* (Farmacêuticos, 2018).

Dentro desta imensa família, as bactérias com maior importância clínica para o Homem pertencem ao género *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. (Ferreira, 2015).

Como referido anteriormente, apesar de algumas destas bactérias fazerem parte da flora natural do intestino dos animais e do Homem, podem por vezes causar infeções. Estas infeções podem ser endógenas oportunistas ou exógenas, como se pode ver no esquema da figura 2 (Atanasova, 2010)(Beveridge, 1999).

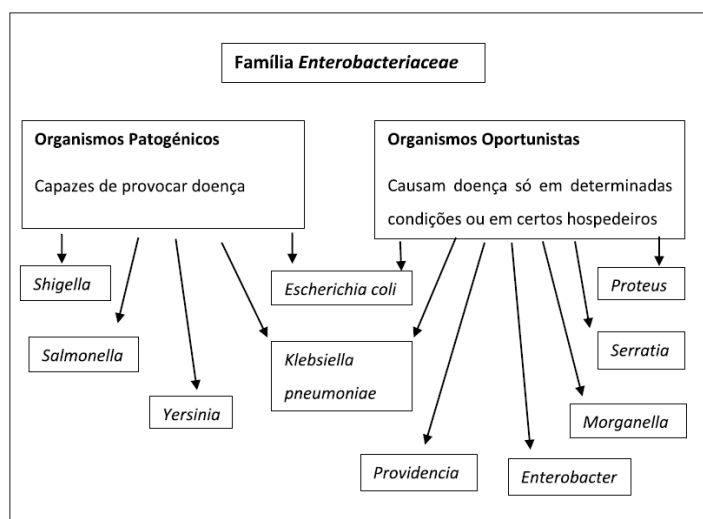


Figura 2: Esquema da Família Enterobacteriaceae Retirado (Ferreira, 2015)

2.1. Estrutura das Enterobactérias

Enterobactérias são bactérias Gram-negativo que para além de apresentarem uma membrana citoplasmática e parede celular, podem também ter cápsula com flagelos como é o caso do género *Klebsiella*, algumas estirpes de *Enterobacter app.* e *Escherichia coli* (Atanasova, 2010)(Beveridge, 1999)(*Microbiologia Médica*, 2014).

A Membrana externa além de controlar as substâncias que a atravessam, a partir das porinas, para substâncias de pequeno tamanho, esta funciona como membrana protetora (*Microbiologia Médica*, 2014). Esta membrana previne e regula a entrada de sais, substâncias tóxicas à bactéria e antibióticos por ser uma barreira extremamente hidrofóbica e pouco permeável, conferindo à bactéria resistência natural aos mesmos (*Microbiologia Médica*, 2014). É também um importante determinante da patogenicidade devido à atividade da endotoxina do lípido A (*Microbiologia Médica*, 2014).

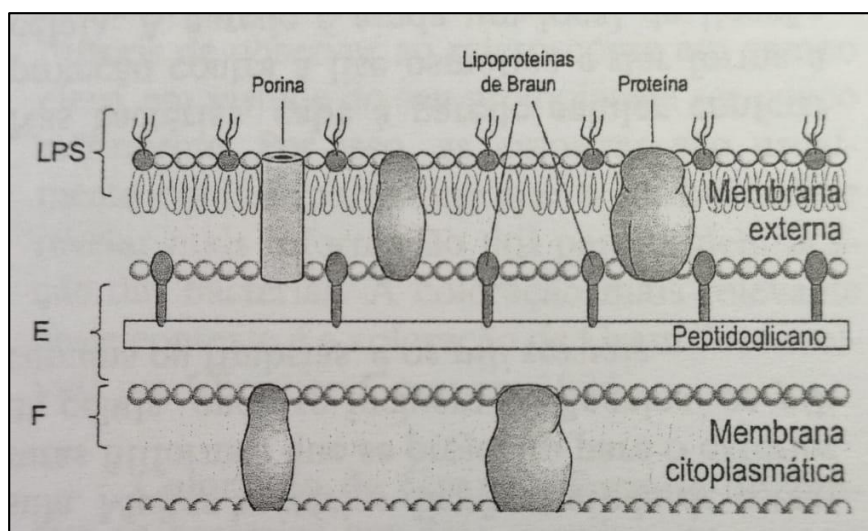


Figura 3. Parede celular de bactérias Gram-negativo. LPS – Lipopolissacárido; E – Espaço periplasmático; F-Fosfolípidos. Retirado (*Microbiologia Médica*, 2014)

A parede celular gram-negativa confere uma notável proteção a estas bactérias. É forte o suficiente para suportar temperaturas e pHs extremos, sendo ainda elástica o suficiente para serem capazes de expandir a área de superfície normal (Bbl et al., 2018) (Atanasova, 2010).

3. Infeções clínicas

Estas bactérias também podem fazer parte da flora normal de alguns indivíduos. Quando é identificada CRE em amostras clínicas, isto pode representar uma infecção ou colonização (Prevention, 2019). Colonização significa que o organismo encontrado não está a causar nenhum sintoma ou doença (Prevetion, 2019b). A colonização por estirpes CRE pode causar infecções oportunistas e disseminar estirpes resistentes para outras pessoas. Por este motivo, é importante existir uma triagem de colonização em Unidades de Saúde, o que pode ajudar a diminuir, ou impedir, a propagação de CRE. Para poder ser feita a identificação destes portadores, existem laboratórios, como o Lab Network, que oferece triagem de colonização gratuita (Prevention, 2019).

As CRE podem causar uma grande variedade de infecções, particularmente em recém-nascidos, pacientes imunocomprometidos, nos serviços de urgência e de urologia (Farsiani, Salimiyan-Rizi, & Ghazvini, 2019).

Causam também pneumonia, associada à ventilação, bacteriemia, meningite pós-neurocirúrgica, meningite neonatal, infecções da pele e tecidos moles, abscessos intra-abdominais e infecções do trato urinário. Estudos concluíram que a maioria das infecções por CRE envolve o trato urinário, geralmente em pessoas que possuem cateter urinário ou retenção urinária (Prevention, 2019).

Alguns dos principais fatores de risco para a disseminação destas bacterias são a má higiene das mãos, aglomeração, baixo peso ao nascer, parto prematuro, intubação de pacientes, internação prolongados, fórmula infantil contaminada, alimentação intravenosa, uso de antibióticos de amplo espectro e uso de cateteres intravenosos (Farsiani et al., 2019).

4. Resistências aos Antibióticos

A resistência aos antibióticos ocorre quando as bactérias não respondem mais aos antibióticos projetados para matá-las. As bactérias, nomeadamente enterobactérias, estão constantemente a encontrar novas formas de resistir aos antibióticos usados para tratar as infeções causadas pelas mesmas (Armand-Lefèvre et al., 2013)(Prevention, 2019).

Bactérias resistentes aos antibióticos são um grande desafio a nível mundial (Frieri, Kumar, & Boutin, 2017) (Partridge, Kwong, Firth, & Jensen, 2018). Infeções causadas por microrganismos multirresistentes (MDR) aumentam significativamente a morbilidade, a mortalidade e os custos em saúde, uma vez que são infeções difíceis de tratar ou mesmo não tratáveis com antimicrobianos convencionais (Frieri et al., 2017)(Partridge et al., 2018). Estes padrões de multirresistência, entre outros fatores, devem-se aos antibióticos de amplo espectro terem sido usados de forma “desnecessária” e à toma incorreta da medicação (Frieri et al., 2017).

Relatórios sobre a disseminação de material genético entre células bacterianas, concluíram que as bactérias são capazes de transferir informação genética entre si. Esta transferência de informação é realizada a partir de Elementos Genéticos Móveis (EGM) (Frieri et al., 2017). Análises moleculares revelaram que a multirresistência generalizada foi comumente alcançada pela aquisição de informação genética a partir de EGM. Este transporte de informação genética pode acontecer, por exemplo, entre cromossomas ou através de plasmídeos (Frieri et al., 2017)(Partridge et al., 2018). Interações entre EGM sustentam a rápida evolução destas bactérias aos diversos antibióticos e adaptação ao hospedeiro (Partridge et al., 2018).

4.1. Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos constituem uma das classes mais antigas de agentes antibacterianos. Os β -lactâmicos usados inicialmente para terapia humana foram isolados de bolores, particularmente *Penicillium chrysogenum* (Dougherty & Pucci, 2014).

Hoje os antibióticos β -lactâmicos, como os da figura 4, têm sido muito utilizados para o tratamento de uma ampla gama de infecções por diferentes agentes bacterianos. Todos estes compostos contêm um elemento farmacofórico estrutural, o anel β -lactâmico e atuam essencialmente bloqueando a síntese de cadeias de peptidoglicano durante a biossíntese da parede celular (Feng et al., 2017)

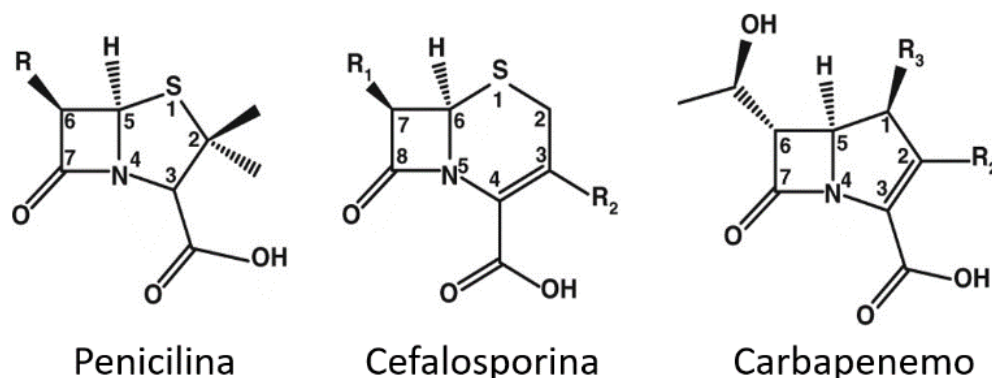


Figura 4: Estrutura molecular de antibióticos β -lactâmicos (Adaptado (Dougherty & Pucci, 2014)).

4.1.1. Resistência a antibióticos β -lactâmicos

No final da década de 1960, quando as bactérias produtoras de β -lactamases surgiram e ameaçaram o uso da penicilina, começou a procura por inibidores destas enzimas β -lactamase (Dougherty & Pucci, 2014). Devido à instabilidade química dos compostos β -lactâmicos foram desenvolvidos dois inibidores de β -lactamase:

- ácido clavulânico, o primeiro inibidor de β -lactamase clinicamente disponível,
- tienamicina de *Streptomyces Cattleya* (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, & Bonomo, 2011).

Apesar de esta classe de antibióticos ser, ainda hoje, a mais utilizada, estes antibióticos apresentam algumas características que os tornam pouco eficazes contra a algumas bactérias (Dougherty & Pucci, 2014).

Assim sendo, a resistência aos β -lactâmicos é um fenômeno alarmante e crescente e, por sua vez, um desafio para a saúde pública, nomeadamente no que diz respeito aos bacilos Gram-negativo (Neelanjana Pandey; Marco Cascella, 2021). Tendo em conta esta crescente e preocupante aquisição de resistências é importante conhecer os mecanismos de resistência. A produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência a estes antibióticos, enzimas que hidrolisam a ligação amida no anel β -lactâmico inativando irreversivelmente os antibióticos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos.

O anel β -lactâmico apresenta alguma instabilidade química, para além disso o uso pouco moderado destes antibióticos durante as últimas décadas levou à evolução e disseminação de β -lactamases (Feng et al., 2017) (Neelanjana Pandey; Marco Cascella, 2021).

No entanto além do mecanismo acima descrito, outros mecanismos são utilizados por parte das bactérias de modo a resistir a estes antibióticos, nomeadamente:

- Diminuição da penetração no alvo, através da síntese de enzimas modificadoras que destroem a atividade de antibióticos,
- Alteração de PBPs do alvo, através de mutações nos elementos de ligação,
- Efluxo por meio de mecanismos de bombeamento específicos, através das proteínas de membrana (Neelanjana Pandey et al., 2021) (Wright, 2005).

4.2. Carbapenemos

Quando as enterobactérias desenvolvem resistência ao grupo de antibióticos designado carbapenemos, estas são consideradas Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos (CRE) (Armand-Lefèvre et al., 2013)(Prevention, 2019).

A resistência aos carbapenemos tem sido reportada com uma frequência crescente e com maior distribuição geográfica desde o princípio dos anos 90. O aumento de CRE representa uma ameaça para os cuidados de saúde e para a segurança dos doentes (Farmacêuticos, 2018).

Infeções por CRE são difíceis de tratar porque estas bactérias não respondem aos antibióticos comumente usados. Ocasionalmente, as CRE são resistentes a todos os antibióticos disponíveis, sendo por isso uma ameaça para a saúde pública (Prevention, 2019b)

Os carbapenemos desempenham um papel importante no combate às bactérias. De entre os antibióticos β -lactâmicos, os carbapenemos apresentam o espectro mais amplo de atividade e a maior potência contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Por este motivo são frequentemente designados como “agentes de última linha” utilizados em pacientes com infeções graves suspeitos de possuírem bactérias com multirresistências a antibióticos (MDR) (Papp-Wallace et al., 2011).

A tienamicina foi o primeiro protótipo de carbapenemo, obtido a partir de *Streptomyces cattleya* e acabaria por ser o composto modelo para todos os carbapenemos (Papp-Wallace et al., 2011). Em comparação com as penicilinas e cefalosporinas convencionais, a cadeia lateral hidroxietil da tienamicina é um desvio radical dessas

estruturas, todas as quais têm um substituinte acilamino no anel β -lactâmico (Papp-Wallace et al., 2011). A estereoquímica dessa cadeia lateral de hidroxietil é um atributo-chave dos carbapenemos sendo importante para a sua atividade (Papp-Wallace et al., 2011).

O primeiro carbapenemo a ser desenvolvido foi o imipenem. O imipenem e o panipenem, identificado posteriormente, eram derivados mais estáveis da tienamicina e menos sensíveis à hidrólise básica em solução. Em 1985, o imipenem (originalmente denominado MK0787) tornou-se o primeiro carbapenemo disponível para o tratamento de infecções bacterianas complexas (Papp-Wallace et al., 2011).

O imipenem, como a tienamicina, demonstrou alta afinidade para PBP e estabilidade contra β -lactamases. No entanto, tanto o imipenem como o panipenem foram suscetíveis à desativação pela desidropeptidase I (DHP-I), enzima renal humana, tendo por isso sido necessário a coadministração com inibidores desta enzima como, cilastatina ou betamipron (Papp-Wallace et al., 2011).

Ao longo da jornada em busca do desenvolvimento de carbapenemos mais estáveis com um espectro mais amplo, surgiram os seguintes compostos atualmente disponíveis: meropenem, biapenem, ertapenem e doripenem (Figura 5) (Papp-Wallace et al., 2011). Um grande avanço nesta foi a adição de um grupo metil que veio a revelar-se protetor contra a hidrólise por DHP-I. Vários carbapenemos foram identificados com essa modificação nas duas décadas subsequentes. Estes novos carbapenemos incluíram carbapenemos com propriedades anti *Pseudomonas* e anti *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, entre outras bactérias (Papp-Wallace et al., 2011).

No entanto, as CRE são uma grande preocupação a nível mundial, por esse motivo é de extrema importância a realização de mais estudos sobre as mesmas. Além destas bactérias serem resistentes a várias classes de antibióticos, limitando substancialmente as opções de tratamento, causam infecções associadas a altas taxas de mortalidade entre pacientes hospitalizados, de até 50% em alguns estudos, sendo que infecções deste tipo podem também ser encontradas na comunidade (Bbl et al., 2018) (Beveridge, 1999). Acredita-se que um subconjunto de CRE, denominado Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos produtoras de carbapenemase (CP-CRE), enzimas que conferem resistência ao carbapenemos, sejam as principais responsáveis pela disseminação

crecente da resistência (Prevention, 2019).

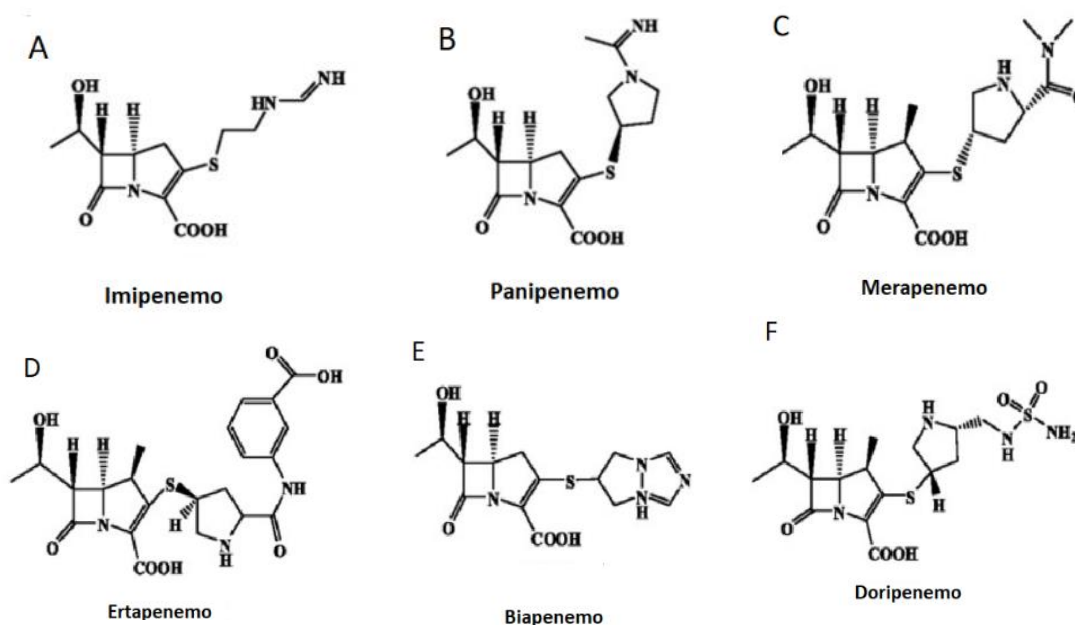


Figura 5: Evolução da estrutura molecular de alguns carbapenemos (Adaptação (Papp-Wallace et al., 2011))

4.2.1. Resistência aos carbapenemos

Apesar de a maioria dos carbapenemos serem eficazes contra bactérias Gram-positivo e negativo, estes são uma classe de antibióticos β -lactâmicos de última linha para infecções graves causadas por bactérias Gram-negativo (Breilh, Texier-Maugein, Allaouchiche, Saux, & Boselli, 2013)(Pollett et al., 2014). O rápido surgimento de enterobactérias resistentes a esta classe tem-se revelado um grande problema de saúde pública a nível global, particularmente porque a resistência a outras classes de β -lactâmicos é cada vez mais comum (Pollett et al., 2014).

As infecções por CRE na Europa e Estados Unidos da América (EUA) encontram-se tipicamente associadas a cuidados de saúde, incluindo infecções do trato urinário, da corrente sanguínea associadas a cateteres centrais, dispositivos médicos, de feridas e pneumonia (Pollett et al., 2014).

Existem diversos mecanismos utilizados por CRE para resistir aos carbapenemos. Um dos mecanismos são as CP-CRE. Estas enzimas vão inativar os carbapenemos e outros antibióticos β -lactâmicos, como as penicilinas. Uma vez que a maioria dos genes produtores de carbapenemases encontram-se em EGM esta resistência facilmente é transmitida para outras bactérias (Prevention, 2019).

Em 2001 foi identificada pela primeira vez nos Estados Unidos a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Desde então, as bactérias produtoras de KPC

espalharam-se amplamente, existindo uma série de outras carbapenemases associadas a EGMs nomeadamente:

- New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM),
- Metallo- β -lactamase codificado por Integron Verona (VIM),
- Imipenemase (IMP),
- Oxacilinase-48 (OXA-48) (Prevention, 2019).

5. Epidemiologia:

As CRE continuam a evoluir, representando uma ameaça crescente para pessoas de todas as idades. O facto dos mecanismos de resistência aos carbapenemos serem vários facilita a rápida propagação destes microrganismos (Logan & Weinstein, 2017).

O reconhecimento precoce dessa ameaça à saúde pública global por meio da caracterização molecular, estudos epidemiológicos e vigilância pode permitir abordagens oportunas na prevenção. Medidas de controlo de infeção, tais como avaliação proativa de portadores assintomáticos, podem ajudar a abrandar a disseminação destas bactérias (Logan & Weinstein, 2017).

Apesar destas bactérias se encontrarem um pouco por todo o mundo, como podemos ver na figura 6, Portugal em 2017 apenas apresentava surtos esporádicos de CRE com as seguintes carbapenemases: KPC e VIM. Apesar de ser preocupante, em comparação com outros países, dentro e fora da Europa, podemos verificar que Portugal tem menos variantes (Logan & Weinstein, 2017). Na Europa a Roménia e a Itália são os países com maior prevalência de CRE, com 31% e 34% respetivamente (Farmacêuticos, 2018)

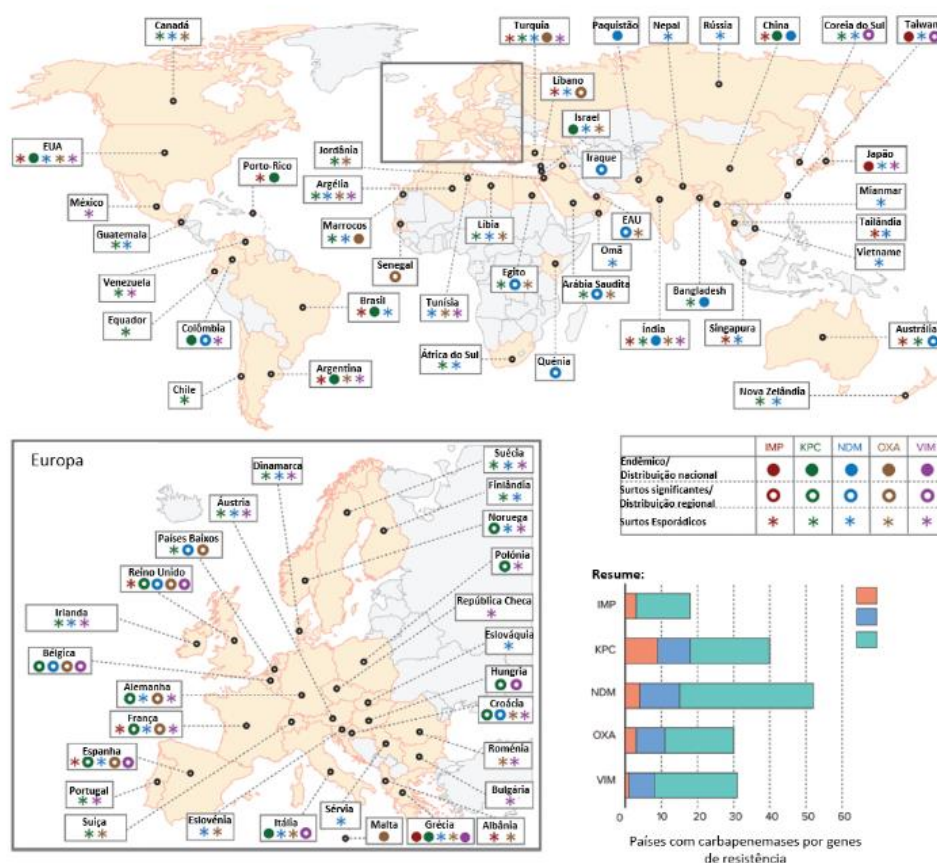


Figura 6: Distribuição mundial de CRE (Adaptado (Logan & Weinstein, 2017))

Contudo cada vez existem mais enterobacterias produtoras de carbapenemases afetando todo o mundo, o que pode ser observado na figura 7. Nesta Figura é perceptívelque desde 2010 Portugal passou da Fase 1, com casos esporádicos, para a fase3 (Brolund et al., 2019).

País	Fase epidemiológica para a propagação de Enterobactérias produtoras de carbapenemase				Mudança epidemiológica entre 2015–2018
	2010	2013	2014/15	2018	
Albânia	NA	2a	1	1	→
Áustria	0	2b	2b	2b	→
Bélgica	2b	3	4	4	→
Bósnia e Herzegovina	1	1	0	2b	↑
Bulgária	0	2a	2a	2b	→
Croácia	1	3	3	4	↑
Chipre	2a	2a	1	2a	↑
República Checa	1	2b	2b	3	↑
Dinamarca	1	2a	4	4	→
Estónia	0	2a	1	1	→
Finlândia	1	2a	2a	3	↑
França	3	3	4	4	→
Alemanha	3	3	3	3	→
Grécia	5	5	5	5	→
Hungria	3	4	4	4	→
Islândia	0	0	0	1	↑
Irlanda	1	4	3	4	↑
Itália	4	5	5	5	→
Kosovo	NA	2b	0	1	↑
Letónia	1	1	1	1	→
Lituânia	1	1	1	1	→
Luxemburgo	NA	1	1	1	→
Malta	1	5	5	5	→
Montenegro	NA	0	1	1	→
Holanda	2a	2b	2a	2b	→
Macedónia do Norte	NA	0	1	2a	↑
Noruega	2a	2a	1	1	→
Polónia	4	3	4	4	→
Portugal	1	1	2b	3	↑
Roménia	1	1	4	4	→
Sérvia	1	1	2b	4	↑
Eslováquia	NA	2a	4	4	→
Eslovénia	0	1	2a	1	↓
Espanha	2b	3	4	4	→
Suécia	2a	2b	2a	2b	→
Turquia	NA	2a	5	5	→
Reino Unido	2b	3	3	3	→

↑: aumento do estágio epidemiológico
→: estágio epidemiológico inalterado
↓: diminuição do estágio epidemiológico

Fases epidemiológicas

- Fase 0: nenhum caso relatado
- Fase 1: ocorrência esporádica (casos únicos epidemiologicamente não relacionados)
- Fase 2a: surto hospitalar único (dois ou mais casos epidemiologicamente associados numa única instituição)
- Estágio 2b: surtos hospitalares esporádicos (surtos hospitalares não relacionados)
- Fase 3: disseminação regional (mais de um surto hospitalar relacionado epidemiologicamente confinado a hospitais que fazem parte da mesma região ou distrito)
- Fase 4: propagação inter-regional (vários surtos epidemiologicamente relacionados que ocorrem em diferentes distritos de saúde)
- Fase 5: situação endêmica (a maioria dos hospitais em um país vê repetidamente casos admitidos)

Figura 7: Comparação das fases epidemiológicas de Enterobactérias produtoras de carbapenemase em países europeus entre 2010 e 2018 (Adaptado (Brolund et al., 2019))

5.1. Prevalência:

Apesar de existirem inúmeras enterobactérias nem todos têm a mesma relevância clínica. Como podemos verificar na figura 8, num estudo realizado no Egito entre 2011 e 2017, as CRE que mais causam doença são *E.coli*, *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* spp (Kotb et al., 2020).

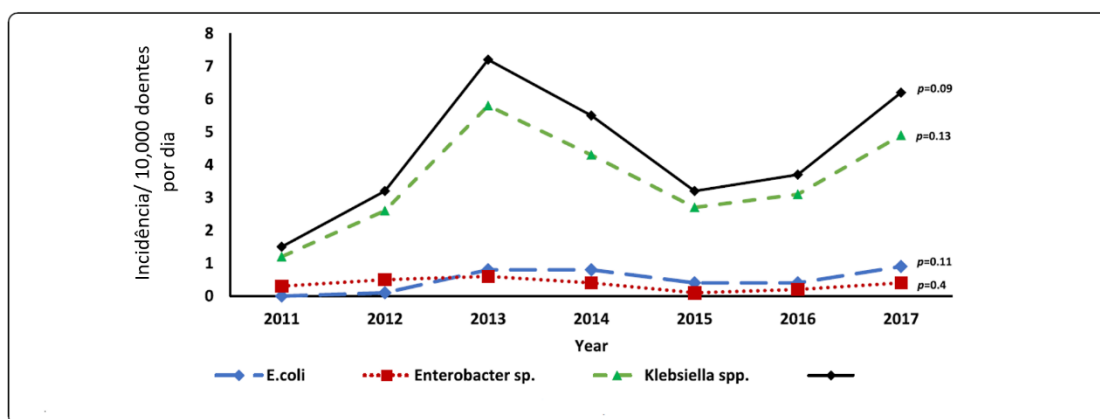


Figura 8: Incidência de CRE em 10,000 doentes por dia entre 2011 e 2017 (Adaptado (Kotb et al., 2020))

Estudos realizados nos Estados Unidos apontam que entre as CRE identificadas, 11% são *Klebsiella pneumoniae* e 2% *Escherichia coli* (Kelly, Mathema, & Larson, 2017).

Dentro destas bactérias com maior significado clínico para o Homem, as carbapenemases KPC, que se tornou endêmica em partes das Américas, sul da Europa, Israel e China, e a NDM, que se tornou endêmica no norte da Europa e na região do Pacífico Asiático, principalmente no Reino Unido e na Índia, são as mais preocupantes (Kelly et al., 2017).

6. CRE associadas a cuidados de saúde

As opções de tratamento para CRE são extremamente limitadas e a mortalidade de infecções associadas a cuidados de saúde (IACS) por CRE excede 50%. Uma incidência crescente de infecções por Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos associadas a cuidados de saúde (CRE-HAI) em hospitais dos EUA foi observada na última década, com 4,6% dos hospitais de cuidados agudos e mais de 17,8% dos hospitais de longa

permanência tendo pelo menos um CRE-HAI em 2012 (Pollett et al., 2014).

A maioria dos casos de CRE-HAI são notificados em hospitais gerais ou obstétricos, podendo também surgir em outras unidades como cirurgia, pediatria e cardiologia (Kotb et al., 2020). Em ambiente hospitalar, CRE são geralmente transmitidas de pessoa para pessoa, pelas mãos de profissionais de saúde ou por meio de equipamentos médicos contaminados (Prevention, 2019).

Assim sendo, para prevenir a transmissão destas bactérias multirresistentes nas unidades de saúde são importantes alguns fatores como:

- Fazer-se rastreios para triagem de CRE
- Aquando da transferência de doentes com CRE informar a da condição dos mesmos,
- Separar doentes infetados ou colonizados por CRE dos restantes
- Higienização correta das mãos por parte dos profissionais de saúde
- Retirar dispositivos médicos como cateteres urinários assim que não forem mais necessários (Prevention, 2019).

Um estudo realizado em 2013 num hospital na Califórnia afirma que 81,7% das CRE isoladas são produtoras de carbapenemases (Pollett et al., 2014)

7. CRE associadas à comunidade

Como foi referido anteriormente estas bactérias encontram-se quer em ambientes relacionados com a prestação de cuidados de saúde, quer na comunidade. Neste último caso os principais reservatórios e fontes de transmissão são os ralos das sanitas e de chuveiros (Prevention, 2019). Esta transmissão pode acontecer em locais públicos, como balneários ou em habitações.

No entanto, outro fator que influencia é roer as unhas, o que pode levar a uma transmissão oral-fecal. Este é um hábito comum em crianças e adultos jovens. A inadequada higienização das mãos, neste caso, pode levar à inoculação de enterobactérias na cavidade oral, o que pode levar a complicações na presença de danos das cutículas ou nas gengivas (Reddy, Sanjai, Kumaraswamy, Papaiah, & Jeevan, 2013)(Tambekar & Shirsat, 2013). Mãos contaminadas desempenham um papel importante na transmissão oral-fecal de doenças. Nos países em desenvolvimento, 80% das doenças estão associadas à má higiene doméstica e pessoal em cerca de 2,2 milhões de pessoas (Reddy et al., 2013)(Tambekar & Shirsat, 2013).

Além disso, num estudo realizado recentemente em 2021, numa população saudável de trabalhadores do ramo da alimentação, foram detetadas *K. pneumoniae* e *E. coli* associadas à comunidade, sendo que de um total de 47 estirpes de *K. pneumoniae*, apenas 1 (2,1%) foi identificada como CRE e de 206 estirpes de *E. coli*, 4 (1,9%) foram identificadas como CRE (Moghnia, Rotimi, & Al-Sweih, 2021). No entanto, estudos realizados nos Estados Unidos revelam a percentagem de CRE associados à comunidade varia entre 5.6% e 10,8% (Kelly et al., 2017).

8. Surgimento de CRE em zaragatoas nasais

Apesar destas bactérias serem maioritariamente associadas aos intestinos, estudos recentes detetaram estas bactérias em zaragatoas nasais (Yameen, Iram, Mannan, Khan, & Akhtar, 2013). Apesar de ser mais fácil justificar este fenómeno em ambiente hospitalar, o mesmo é detetado na comunidade. De modo a perceber melhor como esta disseminação está a acontecer são necessários mais estudos.

9. Objetivo

Sendo a prevalência de CRE na comunidade um problema de saúde pública, devem ser realizados projetos com intuito de identificar estas estirpes na população, de modo a identificar portadores e a rastrear a sua transmissão na comunidade.

Uma vez que estas bactérias extremamente perigosas têm vindo a colonizar outras partes do corpo além do intestino, como é o caso da cavidade nasal, é importante a realização de projetos que visem a identificar estes portadores assintomáticos na comunidade. Por este motivo, foi proposta a realização deste projeto “ Pesquisa de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenemos em zaragatoas nasais”.

Assim sendo, o principal objetivo deste trabalho é identificar a existência de portadores de estirpes de Enterobacterias Resistentes aos Carbapenemos na comunidade, neste caso em estudantes Universitarios na área da saúde, Medicina Dentária.

10. Materiais e Métodos

10.1. Caracterização da amostra

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 908 zaragatoas nasais obtidas no âmbito do projeto “Avaliação da prevalência de portadores de *S. aureus* em estudantes do Mestrado Integrado em Medicina Dentária: evolução ao longo do curso”.

Uma vez que o projeto suprarreferido utilizou zaragatoas nasais, e este trabalho pretende identificar CRE em zaragatoas nasais, estas amostras foram o ponto de partida.

10.2. Metodologia

Para a realização deste trabalho foi necessário dividi-lo em 3 etapas principais, sendo elas as seguintes:

1. Adição de um meio de enriquecimento, BHI, às zaragatoas, para promover a multiplicação bacteriana.
2. Seleção e isolamento de enterobactérias por inoculação, num meio seletivo, MacConkey agar.
3. Identificação de CRE, por inoculação, em meio cromogénico, meio SuperCARBA.

10.3. Enriquecimento

Uma vez que as amostras se encontravam guardadas a -20°C, esta etapa revelou-se crucial para o isolamento. Foi utilizado o caldo Brain Heart Infusion (BHI) como meio de enriquecimento para o crescimento de bactérias (Hou, Fink, Radtke, Sadowsky, & Diez-Gonzalez, 2013) (Becton Dickinson, 2013). O BHI, por ser um meio muito rico, é normalmente utilizado para promover o crescimento de bactérias, sendo que este meio não é seletivo, daí ser necessário outros métodos, como os aplicados posteriormente, para proceder à identificação das bactérias (Hou, Fink, Radtke, Sadowsky, & Diez-Gonzalez, 2013) (Becton Dickinson, 2013).

Para promover ao máximo o crescimento das bactérias, numa primeira fase, foi adicionado 2ml de BHI aos tubos onde estavam as zaragatas e deixado a incubar na estufa a 37°C com agitação por 48h.

Numa segunda fase, foram preparados tubos *falcon* com 1ml de BHI novo e adicionado 1ml do BHI com 48h de crescimento, de modo a potenciar o crescimento, e

mais uma vez foram colocadas na estufa a 37°C com agitação, por 24h, perfazendo assim um total de 72h de crescimento.

10.4. Isolamento de Enterobactérias

Nesta fase do projeto foram apenas utilizadas as amostras que apresentaram turvação, ou seja, crescimento de microrganismos. Com uma zaragatoa humedecida no caldo de BHI procedeu-se à inoculação em meio MacConkey, meio seletivo para enterobactérias.

Após a inoculação, as placas de MacConkey foram incubadas a 35°C/24h, tendo sido posteriormente selecionadas as placas com crescimento. Estas placas foram nomeadas placas com crescimento de enterobactérias.

10.5. Identificação de CRE

Para se proceder à identificação de CRE e caracterização da espécie, foi utilizado o meio cromogénico SuperCARBA agar, uma vez que neste meio apenas permite o crescimento de bacilos Gram-negativo resistentes às carbapenemases e a identificação da espécie inoculada baseado na cor das colónias (Figura 9) (Gitleman, 2014) (Base, 2019).

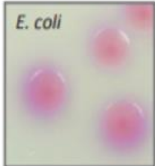
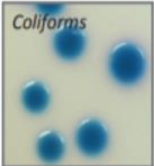
Microrganismo	Aparência típica da colônia
<i>E. coli</i> IMP NCTC 13476	→ Rosa escura a avermelhado
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA 1705	→ Azul metálico
<i>K. pneumoniae</i> KPC NCTC 13438	→ Azul metálico
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	→ Inibido
<i>K. pneumoniae</i> ESBL ATCC® 700603	→ Inibido
Aparência típica da colônia	
	
	

Figura 9: Identificação do tipo de enterobactéria pela coloração do meio SuperCARBA (Adaptado (Base, 2019))

O meio escolhido para identificar CRE foi o SuperCARBA agar pelo facto de detetar uma grande variedade de carbapenemases como, KPC, NDM, VIM, IMP, OXA, com um excelente limite de deteção (10 CFU / mL), mesmo para carbapenemases fracamente expressas como OXA-48, mantendo um alto nível de sensibilidade (24). O procedimento de inoculação foi realizado conforme o indicado nas instruções de uso (Anexo 1 – (Base, 2019)).

Nesta etapa foram apenas utilizadas enterobactérias confirmadas, ou seja, que apresentaram crescimento no meio. Após as amostras serem inoculadas em meio SuperCARBA, as placas foram colocadas na estufa a 37°C/24h a incubar.

As placas com crescimento foram consideradas CRE positivas.

10.6. Teste de Resistência a Antibióticos

De modo a confirmar os resultados obtidos com o meio SuperCARBA, foi realizado antibiograma com discos de antibióticos da classe dos carbapenemos pelo Método de Kirby-Bauer:

- Ertapenem (ETP10)
- Merapenem (MEM10)
- Imipenem (IPM10)

Assim, para o resultado ser resistente os halos formados teriam de ter de diâmetro, respetivamente, $\leq 2,2\text{cm}$ para ETO10 e $\leq 2,4\text{cm}$ para MEM10 e IPM10.

11. Resultados

Na primeira etapa onde se procedeu à adição de BHI, Biokar PVL, apenas 103 amostras, 11,34%, apresentaram crescimento e prosseguiram para a fase de seleção de enterobactérias, tendo assim a amostra inicial de 908 ficado reduzida.



Figura 10: Crescimento em caldo de BHI

Na segunda fase, seleção de enterobactérias, das 103 amostras apenas 6, 54,55%, obtiveram crescimento no meio seletivo MacConkey, BD Quilaban, após as 24h de incubação.

Devido ao meio utilizado ser seletivo para enterobactérias, já é possível fazer uma seleção mais sensível, tendo as 6 amostras sido consideradas enterobactérias prováveis. Tendo em conta que todas as amostras alteraram a cor do meio, originalmente amarelo, para rosa, as estirpes são fermentadoras de lactose.

As amostras que apresentaram crescimento foram as seguintes: 380E, 508D, 293D, 432D, 394E e 95E.

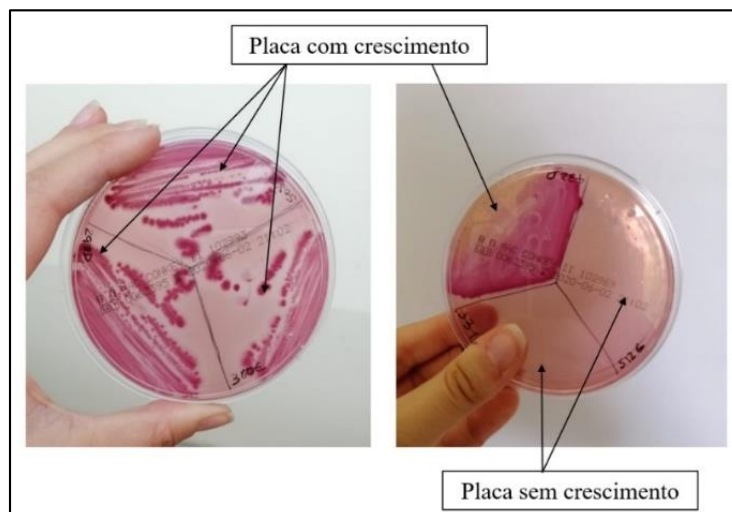


Figura 11: Crescimento das amostras em meio MacConkey.

As amostras que apresentaram crescimento são referentes alunos do 1º ao 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina dentária (MICEF), sendo 4 do sexo feminino e as restantes 2 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 18 e 39 anos, como se pode verificar na tabela 2.

Tabela 1: Caracterização da população das amostras com enterobactérias

Amostra	Ano Curricular	Idade (anos)	Sexo
508D	Primeiro	18	Feminino
432D	Primeiro	18	Masculino
95E	Segundo	20	Feminino
293D	Terceiro	39	Feminino
308E	Terceiro	29	Feminino
392	Quinto	26	Masculino

Na última fase de identificação de CRE foram realizados dois procedimentos.

No primeiro, foi utilizado o meio SuperCARBA, CHROMagar Leaflet, onde todas as amostras revelaram crescimento.

Uma vez que este meio é seletivo para bacilos Gram-negativo resistentes às carbapenemases, o crescimento das 6 amostras revelou que as 6 enterobactérias foram identificadas são CRE, 100%. Como este meio também é cromogénico, foi possível identificar as bactérias pela cor, tendo em todos sido possível observar colónias de cor azul metálico, podendo assim concluir que foram encontrados coliformes. Uma vez que *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* pertencem ao grupo das bactérias coliformes, as bactérias isoladas podem ser referentes a qualquer uma destas espécies (APDA, 2012).

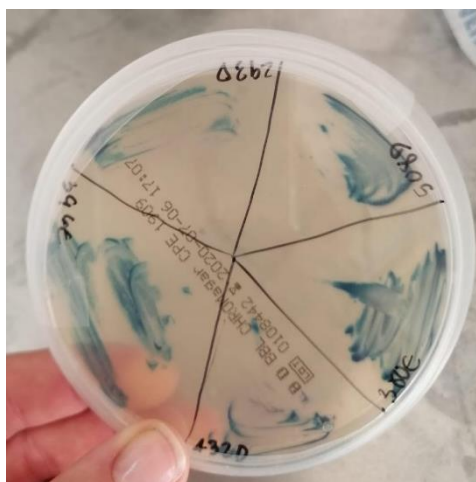


Figura 12: Crescimento das amostras no meio cromogénico SuperCARBA

No segundo procedimento, foram realizados antibiogramas onde todas as amostras mostraram ser sensíveis, tendo formado halos com diâmetros superiores a 2.9cm para os três carbapenemos utilizados, como pode ser visível na figura 13 e na tabela 1.



Figura 13: Exemplo de placa com um TSA com carbapenemos de uma das amostras

Tabela 2: Resultados dos Antibiogramas realizados

Antibióticos	Tamanho em cm do diâmetro dos halos de inibição					
	95E	293D	380E	394E	432D	508D
ETM	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
IPM	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível
MEM	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível	Sensível

12. Discussão de Resultados:

A amostra inicial foi reduzida de 908 zaragatoas a 103. Ou seja, apenas 11% da amostra apresentou condições de prosseguir com a identificação. Isto pode dever-se ao facto de a colheita das amostras ter sido realizada há cerca de 2 anos e a maioria ter morrido ao longo do tempo.

Quanto à identificação de enterobactérias, dessas 103 zaragatoas, apenas 5,8% revelou ser enterobactéria. Este resultado baixo era espectável uma vez que a amostra ideal para a deteção de enterobactérias seria através de zaragatoa retal, que não são fáceis de obter.

No entanto no que diz respeito à identificação de CRE, aquando da utilização do meio SuperCARBA, neste trabalho as 6 amostras identificadas como sendo enterobactérias foram reconhecidas como sendo CRE, ou seja 100% das enterobactérias são CRE, sendo que na amostra total representam 5,8%. Esta percentagem em comparação com um estudo realizado nos Estados Unidos, onde a percentagem de pessoas colonizadas com CRE ronda os 5,6% a 10,8%, é bastante semelhante (Kelly et al., 2017). No entanto os TSA das amostras realizados para os carbapenemos Ertapenem, Merapenem e Imipenem deram todos os resultados Sensível, contradizendo o meio cromogénico.

Devido ao período de confinamento, consequência da pandemia COVID-19, a universidade encontrou-se encerrada, tendo o meio cromogénico SuperCARBA utilizado passado de validade e ficado um pouco desidratado. Esta discrepância de resultados pode dever-se a este facto, levando a alteração das propriedades do meio que permitiu que todas as enterobactérias sensíveis se desenvolvessem. Num estudo realizado em estudantes da universidade do Peradeniya, foram utilizados para detetar a presença de CRE apenas os carbapenemos, imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), não tendo sido detetadas CRE (Munasinghe et al., 2021). Atendendo apenas aos resultados obtidos a partir do TSA realizado, os resultados obtidos são iguais, pois não foram observadas resistências. Assim sendo, uma vez que nos estudos mencionados anteriores os carbapenemos mais utilizados para a deteção de CRE são o imipenem (10 µg) e meropenem (10 µg), e ambos foram utilizados no TSA realizado, o resultado mais sustentado neste estudo será que não foram detetadas CRE (Simões et al., 2020)(Munasinghe et al., 2021).

Além disso, devido às limitações que o meio SuperCARBA apresenta na identificação precisa de espécies de bactérias, em trabalhos futuros é aconselhado a realização de testes complementares para que esta identificação seja o mais exata possível, como a realização de API.

13. Conclusão:

Neste trabalho foi possível identificar 6 amostras como sendo enterobactérias, sendo estas pertencentes ao grupo das bactérias coliformes.

É importante realçar que estas bactérias estão presentes quer na comunidade quer em ambiente hospitalar. Como a maioria das bactérias, enterobactérias têm facilidade em criar resistência aos antibióticos, daí a importância da prevenção, uma vez que são das mais multirresistentes, sendo um grave problema de saúde pública.

É de realçar ainda o facto de que estas bactérias, usualmente encontradas no intestino, estão factualmente a colonizar outras áreas do corpo como as fossas nasais. Ainda existem poucos estudos nesta área, daí ser tão relevante aprofundar este tema.

Para projetos futuros nesta área é aconselhado a realização de mais métodos de identificação para enterobactérias, e recolha de amostras em outras populações. Gostaria de deixar duas hipóteses a serem tidas em conta.

Sabendo que a transmissão oral-fecal é uma realidade e que acontece devido à incorreta higienização das mãos, e sabendo que algumas crianças e jovens têm o hábito de limpar o nariz com os dedos, sugiro estudos que avaliem o isolamento de enterobactérias multirresistentes, nomeadamente CRE, em zaragatoas nasais.

Gostaria também de colocar a hipótese da prática de sexo oral com mulheres poder aumentar a prevalência de enterobactérias MDR em zaragatoas nasais. Esta ideia é fundamentada na anatomia das mulheres que poderá ser um fator de risco para a colonização de bactérias entéricas no nariz.

Apesar destas hipóteses serem inovadoras, é importante destacar a dificuldade eminente na obtenção destas populações com características tão específicas, além de a obtenção das amostras também não ser de fácil execução.

É de salientar que, devido à Pandemia que vivemos tive meses em que não foi possível trabalhar na tese, pois não pude frequentar o laboratório. Devido a esses meses, o trabalho foi atrasado e o meio cromogénico passou de validade, comprometendo os resultados, o que pode ter resultado em resultados tão díspares entre o meio cromogénico e o TSA.

Na minha opinião a realização deste trabalho foi bastante desafiante. Num curto

espaço de tempo foi possível analisar várias amostras e comprovar que estas bactérias que normalmente colonizam os intestinos existem também noutras partes do corpo. Isto é algo que não pode ser de modo algum menosprezado pois, estas bactérias podem possuir resistência à última linha de tratamento para as mesmas, o que em caso de doença pode refletir-se em grande dificuldade de tratamento ou mesmo impossibilidade de o implementar. É importante percebermos o porquê destas novas colonizações acontecerem e incentivar medidas de prevenção. Apesar dos contratempos que surgiram ao longo do projeto fico satisfeita pelos resultados apresentados e espero incentivar mais pessoas a realizar trabalhos sobre o tema.

Referências Bibliográficas

- APDA. (2012). Ft-Mb-02 - Bactérias Coliformes. *Apda*, 2, 1–2.
- Armand-Lefèvre, L., Angebault, C., Barbier, F., Hamelet, E., Defrance, G., Ruppé, E., ... Andremont, A. (2013). Emergence of imipenem-resistant gram-negative bacilli in intestinal flora of intensive care patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1488–1495.
- Atanasova, K. R. (2010). Interactions between porcine respiratory coronavirus and bacterial cell wall toxins in the lungs of pigs, (January 2010), 140. Schematic-structure-of-Gram-positive-and-Gram-negative-cell-walls-Gram-positive-cell.ppm
- Base, B. (2019). CHROMagar mSuperCARBA. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Bbl, B. D., Oxidase, D., Procedimento, P. D. O., Bbl, B. D., Oxidase, D., Bbl, B. D., ... Oxidase, D. (2018). BBL DrySlide Oxidase, (03), 1–4.
- Becton Dickinson. (2013). Brain Heart Infusion (BHI) agar. *Becton Dickinson*, (April), 24–26.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16), 4725–4733.
- Breilh, D., Texier-Maugein, J., Allaouchiche, B., Saux, M. C., & Boselli, E. (2013). Carbapenems. *Journal of Chemotherapy*, 25(1), 1–17.
- Brolund, A., Lagerqvist, N., Byfors, S., Struelens, M. J., Monnet, D. L., Albiger, B., & Kohlenberg, A. (2019). Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in europe, assessment by national experts from 37 countries, july 2018. *Eurosurveillance*, 24(9), 1–8.
- Calisto, F. A. G. (2011). Emergência de Carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae*: o desafio de bactérias multirresistentes e virulentas.
- Dougherty, T. J., & Pucci, M. J. (2014). *Antibiotic discovery and development. Antibiotic Discovery and Development*.
- Farmacêuticos, Ordem. dos. Enterobactérias resistentes ao carbapenemos ameaçam a Europa. 2018. Disponível em <<https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/enterobacterias-resistentes-ao->

- carbapenemos-ameacam-a-europa/> Acesso em 26 out. 2021.
- Farsiani, H., Salimiyan-Rizi, K., & Ghazvini, K. (2019). Clinical and pathogenesis overview of Enterobacter infections. *Reviews in Clinical Medicine*, 6(4), 146–154.
- Feng, H., Liu, X., Wang, S., Fleming, J., Wang, D. C., & Liu, W. (2017). The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis. *Nature Communications*, 8(1).
- Ferreira, R. (2015). Resistência de enterobacteriaceae a antibióticos beta-lactâmicos.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378.
- Leaflet, CHRO Magar msuperCARB, The Chromogenic Mediam Pionner. Version 9.0. Paris 2014.
- Hou, Z., Fink, R. C., Radtke, C., Sadowsky, M. J., & Diez-Gonzalez, F. (2013). Incidence of naturally internalized bacteria in lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 260–265.
- KASVI. (2019). No Title Coloração de Gram – O que é bactéria Gram-positiva e Gram-negativa
- Kelly, A. M., Mathema, B., & Larson, E. L. (2017). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(2), 127–134.
- Kotb, S., Lyman, M., Ismail, G., Abd El Fattah, M., Girgis, S. A., Etman, A., ... Talaat, M. (2020). Epidemiology of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Egyptian intensive care units using National Healthcare-associated Infections Surveillance Data, 2011-2017. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 1–9.
- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *Journal of Infectious Diseases*, 215(Suppl 1), S28–S36.
- Barroso, H; Meliço-Silvestre, A; Taveira, N. Microbiologia Médica. LIDEL Lisboa, 2014.
- Moghnia, O. H., Rotimi, V. O., & Al-Sweih, N. A. (2021). Monitoring antibiotic resistance profiles of faecal isolates of Enterobacteriaceae and the prevalence of carbapenem-resistant isolates among food handlers in Kuwait. *Journal of Global*

- Antimicrobial Resistance*, 25, 370–376.
- Munasinghe, T., Vidanapathirana, G., Kuthubdeen, S., Ekanayake, A., Angulmaduwa, S., De Silva, K., Ip, M. (2021). Colonization with selected antibiotic resistant bacteria among a cohort of Sri Lankan university students. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1–8.
- Neelanjana Pandey; Marco Cascella. (2021). Beta Lactam Antibiotics.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 1–61.
- Pollett, S., Miller, S., Hindler, J., Uslan, D., Carvalho, M., & Humphries, R. M. (2014). Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), 4003–4009.
- Prevention, C. for D. C. and. (2019). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE).
- Reddy, S., Sanjai, K., Kumaraswamy, J., Papaiah, L., & Jeevan, M. (2013). Oral carriage of enterobacteriaceae among school children with chronic nail-biting habit. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 17(2), 163–168.
- Simões, A., Lima, M., Brett, A., Queiroz, C., Chaves, C., Oliveira, H., Rodrigues, F. (2020). Infecções Urinárias Causadas por Enterobacteriaceae Produtoras de β -Lactamases de Espectro Expandido Adquiridas na Comunidade num Hospital de Nível III - Um Estudo Retrospectivo. *Acta Médica Portuguesa*, 33(7–8), 466.
- Tambekar, D., & Shirsat, S. (2013). Role of hand washing and factors for reducing transmission of enteric infections among students of Amravati district. *Science Research Reporter*, 3(2), 175–182.
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470.
- Yameen, M. A., Iram, S., Mannan, A., Khan, S. A., & Akhtar, N. (2013). Nasal and perirectal colonization of vancomycin sensitive and resistant enterococci in patients

of paediatrics ICU (PICU) of tertiary health care facilities. *BMC Infectious Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-156>

Anexos

Anexo I. Instruções sobre meio SuperCARBA

CHROMagar™ mSuperCARBA™

Instructions For Use

For Research Use Only (RUO).

Not for use in diagnostic procedures.

ENGLISH

Instructions For Use

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

CHROMagar™ mSuperCARBA™ can be used with the following specimens: perineal, rectal specimens, stools and urine.

This medium can be also used in food industry with the following specimens: livestock and poultry.

Use of transport devices approved for collection of such specimens is recommended.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Standard microbiological laboratory material for culture media preparation, control, streaking, incubation and waste disposal.

INOCULATION

Related samples can be processed by direct streaking on the plate.

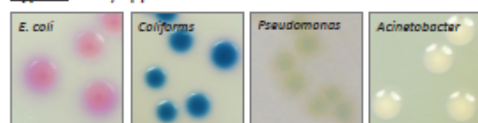
- If the agar plate has been refrigerated, allow to warm to room temperature before inoculation.

- Streak sample onto plate.
- Incubate in aerobic conditions at 35-37 °C for 18-24 hours.

INTERPRETATION

Microorganism	Typical colony appearance
CPE <i>E. coli</i>	→ dark pink to reddish
CPE Coliforms	→ metallic blue
CPO <i>Pseudomonas</i>	→ translucent, +/- natural pigmentation cream to green
CPO <i>Acinetobacter</i>	→ cream
Other Gram (-) CPO	→ colourless, natural pigmentation
Non-CPE <i>E. coli</i> /Coliforms	→ inhibited
Other Gram (-) non-CPO	→ inhibited
Gram (+) bacteria	→ inhibited

Typical colony appearance



The pictures shown are not contractual.

PERFORMANCE

In the following study, 211 rectal swabs were tested at 24 h incubation at 35 °C.

	CHROMagar™ mSuperCARBA™
Sensitivity	100 % *
Specificity	100 % *

* Data obtained from the study «CHROMagar™ mSuperCARBA: performance in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates characterized at molecular level and routine surveillance rectal swabs specimens» R. Canton et al. 2016 Diagnostic Microbiology & Infectious Disease Volume 87.

LIMITATIONS AND COMPLEMENTARY TESTS

- Species final identification may require additional testing such as biochemical tests.
- CPE characterization can be done using methods based on the detection of the acidification resulting from imipenem hydrolysis or by susceptibility testing methods, directly from CHROMagar™ mSuperCARBA™.
- Some strains with multidrug resistance or with a decrease in membrane permeability may grow.
- Some strains showing a low level of carbapenem resistance may have an irregular to poor growth.
- Rarely, some VRE may grow in blue small colonies.

QUALITY CONTROL

Please perform Quality Control according to the use of the medium and the local QC regulations and norms.

Good preparation of the medium can be tested, isolating the following ATCC strains:

Microorganism	Typical colony appearance
<i>E. coli</i> IMP NCTC 13476	→ dark pink to reddish
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA 1705	→ metallic blue
<i>K. pneumoniae</i> KPC NCTC 13438	→ metallic blue
<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	→ inhibited
<i>K. pneumoniae</i> ESBL ATCC® 700603	→ inhibited

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For Research Use Only (RUO). Not for use in diagnostic procedures.
- This laboratory product should be used only by trained personnel (healthcare professional, etc). Wear appropriate protective clothing, gloves and eye/face protection and handle appropriately with procedures and good laboratory practices.
- Use of the medium may be difficult for people who have problems recognising colours.
- For a good microbial detection, collection and transport of specimen should be well handled and adapted to the particular specimen according to good laboratory practices.
- Culture media should not be used as manufacturing material or components.
- Do not ingest or inhale the product.
- Do not use the product after the expiry date.
- Do not use the product if it show any evidence of contamination or any sign of deterioration.
- Do not use the product if the packaging is damaged.
- Any change or modification in the procedure may affect the results.
- Any change or modification of the required storage temperature may affect the performance of the product.
- Unappropriate storage may affect the shelf life of the product.
- Recap the bottles/vials tightly after each preparation and keep them in a low humidity environment, protected from moisture and light.
- Reading and interpretation should be performed using isolated colonies.

CHROMagar™
The Chromogenic Media Pioneer

CHROMagar 4 place du 18 juin 1940
75006 Paris - France
Email: CHROMagar@CHROMagar.com
Tel +33 (0)1.45.48.05.05. Website: www.CHROMagar.com

