



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Perfil fenotípico das estirpes de  
*Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos  
na ULS-Guarda**

**(Versão final após defesa)**

**Inês Sofia Martins Valado**

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Doutora Fátima Madureira Vale  
Coorientadora: Prof. Doutora Albertina Amaro

**Covilhã, julho de 2019**

# Agradecimentos

Encaro este trabalho como sendo uma nova etapa, um novo desafio, mas sempre com a mesma determinação.

Consciente que um trabalho de mestrado é um longo caminho de aprendizagens, quer a nível académico quer a nível pessoal, onde os desafios são permanentes, diários e a gestão de emoções só foi possível com o apoio incondicional de todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho. A simplicidade está no ato de saber agradecer e é a eles que dedico as próximas palavras. Todos foram peças essenciais para eu conseguir o meu equilíbrio e a minha superação. Cada um deles foi uma peça diferente com o encaixe perfeito para cada situação.

É de enaltecer, toda a dedicação, disponibilidade e motivação diária da minha Orientadora Doutora Fátima Vale, e da minha Coorientadora Doutora Albertina Amaro, um sincero agradecimento.

A todos os profissionais do Laboratório de Microbiologia por todo o empenho e paciência que demonstraram desde o início desta jornada. À Joana e à Rita, agradeço principalmente por toda a paciência, amizade e apoio que me deram.

Aos meus Pais, obrigada por tudo aquilo que me ensinaram e ensinam diariamente e por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida, não tenho palavras para descrever toda a gratidão que sinto. Obrigada por acreditarem.

À minha família, em especial à minha prima São e ao meu Padrinho, por estarem sempre disponíveis e sempre assertivos em todos os conselhos.

À Joana pela ajuda incansável, paciência, motivação e por ter sempre uma palavra de apoio.

Nestas coisas acabamos sempre por nos esquecer de enunciar algum nome, por isso desde logo agradeço a todos. Eles sabem quem são.

O meu sincero obrigada por todas as gargalhadas, palavras, opiniões e correções que contribuíram para eu crescer.

Até aqui o caminho foi nosso, a partir de agora o caminho é meu.

## Resumo

Os antimicrobianos exercem um papel fundamental na prevenção e tratamento de infeções, mas a sua prescrição excessiva contribui para o aparecimento de microrganismos resistentes. A resistência das bactérias aos antimicrobianos constitui uma grande preocupação para a sociedade atual porque se estende a quase todos os antimicrobianos disponíveis, reduzindo as terapêuticas alternativas e aumentando os custos do sistema de saúde. Estima-se que estas resistências terão um custo anual em todo o mundo de 105 biliões de dólares e de acordo com o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC) serão responsáveis pela morte de 25000 pessoas a cada ano na Europa.

Os antibióticos mais prescritos e utilizados na prática clínica são os betalactâmicos, de que fazem parte os carbapenemos. Estes antibióticos representam a última linha no tratamento de infeções por bactérias multirresistentes, por isso a rápida emergência da sua resistência constitui uma preocupação para os serviços de saúde e públicos.

O presente estudo teve como objetivo a avaliação dos perfis fenotípicos de resistência a todos os antibióticos testados em estirpes produtoras de carbapenemases, bem como os produtos, onde foram isolados na Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda, de forma a conhecer a epidemiologia local (estudo de distribuição e dos fatores condicionantes e determinantes).

**Palavras-chave:** betalactâmicos; carbapenemos; carbapenemases; *Enterobacteriales*;

## Abstract

The antimicrobials play an important role preventing and treating infections, but its excessive prescription contributes to microorganism resistance.

Bacteria have become antimicrobials-resistant and that has arisen great concern among current society, because it includes almost all antimicrobials available, reducing the use of alternative therapeutic and increasing the costs of health system. Experts predict this resistance will cost 105 billion dollars a year and, according to the European Centre of Disease Prevention and Control (ECDC), it will be responsible for 25000 deaths each year in Europe.

The most used and prescribed are betalactams antibiotics, which include carbapenem. They are usually reserved for multi-resistant bacterial infections, so the increasing rates of resistance are of great concern to public health system.

This research was conducted to evaluate the phenotypic pattern of resistance including all carbapenem antibiotics tested and also to analyse the places where they were isolated in Local Health Unit (ULS) of Guarda, in order to be aware of the local epidemiology (a study of distribution and conditioning and determining factors).

**Keywords:** betalactams; carbapenems; carbapenemases; *Enterobacteriales*;

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| Resumo.....   | iii       |
| Abstract.....   | iv        |
| Lista de figuras.....                                       | vi        |
| Lista de tabelas.....                                       | vii       |
| Lista de gráficos.....                                      | viii      |
| Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos.....    | ix        |
| <b>1. Introdução.....</b>                                   | <b>11</b> |
| 1. Mecanismo de ação dos betalactâmicos.....                | 13        |
| 2. Mecanismos de resistência .....                          | 13        |
| 1.2.1. Bombas de efluxo .....                               | 13        |
| 1.2.2. Impermeabilidade da membrana externa.....            | 14        |
| 1.2.3. Modificação dos alvos (PBPs).....                    | 14        |
| 1.2.4. Hidrólise enzimática.....                            | 14        |
| 3. Classificação das carbapenemases.....                    | 14        |
| 1.3.1. Classe A.....  | 15        |
| 1.3.2. Classe B.....  | 15        |
| 1.3.3. Classe D.....  | 16        |
| 4. Epidemiologia.....                                       | 17        |
| 5. Fatores de risco.....                                    | 20        |
| 6. Métodos de deteção.....                                  | 23        |
| <b>2. Objetivos.....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>3. Métodos .....</b>                                     | <b>27</b> |
| 1. Identificação de isolados bacterianos.....               | 27        |
| 2. Testes de screening.....                                 | 27        |
| 3. Testes confirmatórios da presença de carbapenemases..... | 28        |
| <b>4. Resultados.....</b>                                   | <b>29</b> |
| <b>5. Discussão.....</b>                                    | <b>44</b> |
| <b>Referências Bibliográficas.....</b>                      | <b>48</b> |

# Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Descoberta de antibióticos e surgimento de resistência por parte das bactérias  | 11 |
| <b>Figura 2</b> - Divisão das $\beta$ -lactamases segundo classificação molecular e funcional   | 16 |
| <b>Figura 3</b> - Distribuição global das resistências bacterianas aos carbapenemos   | 19 |
| <b>Figura 4</b> - A - RAPIDEC® CARBA NP; B - CIM, B1- Resultado positivo para a presença de carbapenemase; B2- Resultado negativo; C - Imunoensaios de fluxo lateral com as diversas carbapenemases | 25 |
| <b>Figura 5</b> - Métodos utilizados para detetar microrganismos com resistência aos carbapenemos   | 26 |
| <b>Figura 6</b> - A - RAPIDEC® CARBA NP; B - E-teste  | 28 |

## Lista de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Fatores de risco associados às infecções provocadas pelas CPE  | 22 |
| <b>Tabela 2</b> - Número de isolados no Hospital Nossa Senhora da Assunção e no Hospital Sousa Martins, no ano de 2016 | 29 |
| <b>Tabela 3</b> - Número de isolados no Hospital Nossa Senhora da Assunção e no Hospital Sousa Martins, em 2017        | 29 |
| <b>Tabela 4</b> - Número de isolados no Hospital Nossa Senhora da Assunção e no Hospital Sousa Martins, no ano de 2018 | 30 |
| <b>Tabela 5</b> - Produtos biológicos nos quais foram isoladas as estirpes com resistência, no ano de 2016             | 33 |
| <b>Tabela 6</b> - Produtos biológicos nos quais foram isoladas as estirpes com resistência, em 2017                    | 34 |
| <b>Tabela 7</b> - Produtos biológicos nos quais foram isoladas as estirpes com resistência, no ano 2018                | 34 |
| <b>Tabela 8</b> - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo, no ano 2016                                 | 36 |
| <b>Tabela 9</b> - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo, em 2017                                     | 39 |
| <b>Tabela 10</b> - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo, no ano de 2018                             | 41 |

## Lista de Gráficos

|  |    |
|--|----|
| <b>Gráfico 1</b> - Evolução do número de isolados na ULS com carbapenemases  | 30 |
| <b>Gráfico 2</b> - Percentagem de isolados com carbapenemases nos respetivos hospitais   | 31 |
| <b>Gráfico 3</b> - Percentagem de estirpes resistentes aos carbapenemos, isoladas nos diversos serviços de saúde da ULS-Guarda | 31 |
| <b>Gráfico 4</b> - Género (%) dos indivíduos nos quais as bactérias com carbapenemases foram identificadas                     | 32 |
| <b>Gráfico 5</b> - Intervalos de idade (%) nas quais foram isoladas estirpes com carbapenemases                                | 32 |
| <b>Gráfico 6</b> - Estirpes produtoras de carbapenemases isoladas na ULS- Guarda, de 2016 a 2018                               | 33 |
| <b>Gráfico 7</b> - Número de isolados nos diferentes produtos, desde 2016 a 2018   | 35 |
| <b>Gráfico 8</b> - Evolução da percentagem de resistência aos variados antibióticos, 2016 - 2018                               | 43 |

# Lista de Abreviaturas, Acrónimos, Siglas e Símbolos

ABC - ATB-Binding Cassete

BLSE - betalactamases de largo espectro

BCT - teste Blue-Carba

CDT - Teste de combinação de discos

CIM - Método de inativação do carbapenemo

*C. freundii* - *Citrobacter freundii*

CPE - estirpes produtoras de carbapenemases

DGS - Direção Geral de Saúde

*E. coli* - *Escherichia coli*

*E. cloacae complex* - *Enterobacter cloacae complex*

EARS-Net - Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana

ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças

ESAC-Net - Rede Europeia de Vigilância do Consumo de Antimicrobianos

EUCAST - Comité Europeu sobre testes de suscetibilidade antimicrobiana

GES - Guiana largo espectro

GIM - Imipenemase alemã

IMI - hidrolisa o imipenem

IMP - Imipenemase Metallo-betalactamase

*K. pneumoniae* - *Klebsiella pneumoniae*

KPC - Carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*

LFIA - Imunoensaio de fluxo lateral

MATE - Multidrug And Toxic compound Extrusion

MBL -Metallo-betalactamase

MIC - Concentração mínima inibitória

MHT - Teste modificado de Hodge

MFS - Major Facilitator Superfamily

NDM - Nova Delhi Metallo-betalactamase

NMC - não-metaloenzima carbapenemase

OMS - Organização Mundial de Saúde

OXA - Oxacilinase

*P. aeruginosa* - *Pseudomonas aeruginosa*

PBPs - proteínas de ligação à penicilina

PCR - Reação em cadeia da polimerase

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

RND - Resistance-Nodulation-Division

SIM - Imipenemase Seoul

SME - enzima *Serratia marcescens*

SMR - Small Multidrug Resistance

SPM - Metalobetalactamase de São Paulo

TSA - teste de suscetibilidade antimicrobiana

UCSP - Unidades de Cuidados de Saúde Personalizados

ULS - Unidade local de saúde

UTI - Internamento na unidade de terapia intensiva

VIM - Verona Integron-encoded Metalobetalactamase

VRSA - *Staphylococcus aureus* com resistência à vancomicina

# Capítulo 1

## 1. Introdução

Os antibióticos desempenham um papel fundamental na prevenção e tratamento de variadas infeções, proporcionando uma maior longevidade (Ang H. and Sun X., 2018). Nos últimos 70 anos, a era dos antibióticos foi marcada por sucessivas descobertas de novas moléculas e consequente emergência de resistências (Codjoe F. and Donkor E., 2017). Embora consigam reduzir infeções e matar bactérias (Ang H. and Sun X., 2018), o seu papel tem vindo a sofrer alguns contratempos pois o número de bactérias resistentes aos mesmos tem aumentado de forma avassaladora uma vez que as bactérias adquirem a capacidade de se adaptarem e ainda desenvolverem mecanismos de resistência (Codjoe F. and Donkor E., 2017). O histórico das resistências ao longo dos anos pode ser facilmente verificado na figura 1 (Ventola L., 2015).

A resistência bacteriana continua a crescer e a pesquisa e síntese de novas drogas pela indústria farmacêutica não tem acontecido para substituir os antibióticos existentes e contra os quais já se desenvolveu resistência (Codjoe F. and Donkor E.,

2017). O desenvolvimento de resistências bacterianas tem contribuído para uma maior taxa de mortalidade e morbidade e consequentemente representa um grande impacto económico (Meier M. and Hamprecht A., 2018). Estima-se que a resistência antimicrobiana terá um custo anual em todo o mundo de 105 biliões de dólares e segundo o ECDC será responsável pela morte de 25000 pessoas a cada ano na Europa. Estas resistências têm evoluído rapidamente originando constantemente desafios para a saúde pública (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

Alguns dos fatores que contribuem para essa resistência são o uso excessivo e inadequado de medicamentos (Ventola L., 2015). O seu uso excessivo deve-se ao facto de serem cada vez mais

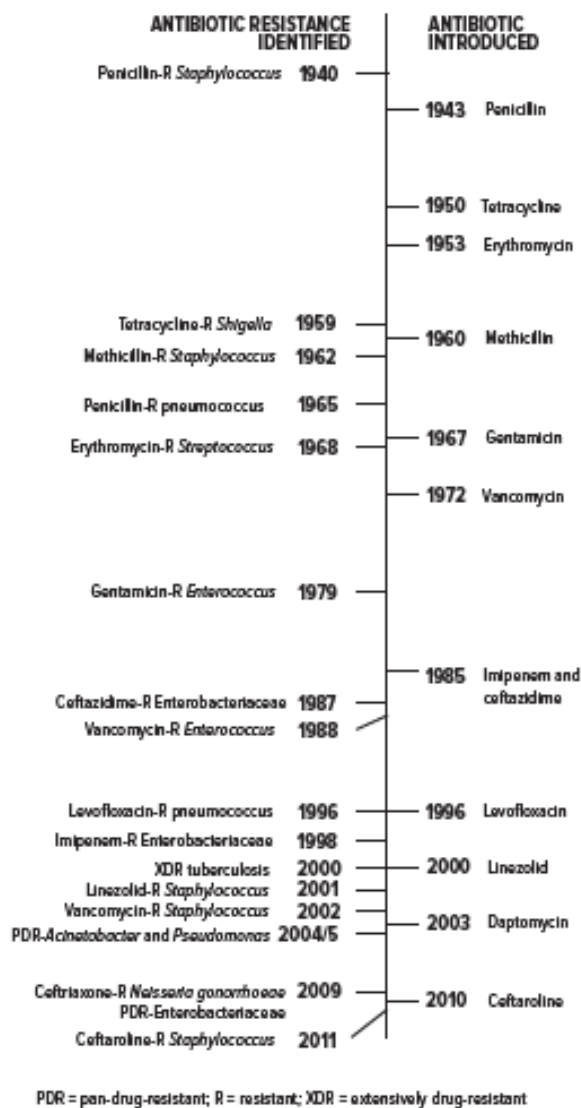


Figura 1 - Descoberta de antibióticos e surgimento de resistência por parte das bactérias (Ventola L., 2015).

baratos, acessíveis e abundantes, o que também contribui para a sua ampla utilização como suplementos de crescimento na alimentação de animais de criação (Meletis G., 2016).

Os antibióticos mais frequentemente prescritos são os betalactâmicos, pois têm elevada eficácia terapêutica e baixa toxicidade para o Homem (Calisto F., 2011). Possuem como característica comum o anel betalactâmico e atuam diretamente sob as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), presentes na membrana externa das bactérias (Meletis G., 2016). Como se trata de um grupo bastante amplo, é necessário subdividi-lo segundo os grupos funcionais de modo a facilitar a compreensão e prescrição. Dentro desta classe incluem-se as penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenemos, monobactâmicos e inibidores de betalactamases (como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (Letourneau A., 2017).

As penicilinas e cefalosporinas de primeira geração foram os primeiros antibióticos aos quais as bactérias adquiriram resistência através da produção de  $\beta$ -lactamases. Foi necessário desenvolver novos antibióticos para as combater e então surgiram as cefalosporinas de segunda e terceira geração. Como as bactérias conseguem adaptar-se rapidamente, começaram a produzir outro tipo de  $\beta$ -lactamases, as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (BLSE), que conferem resistências às penicilinas, cefalosporinas e aztreonamo, não sendo no entanto ativas contra as cefamicinas (cefotetam e cefoxitina), inibidores de  $\beta$ -lactamases e carbapenemos. Os carbapenemos diferem dos outros  $\beta$ -lactâmicos constituindo o grupo com maior atividade, por ser uma molécula zwitteriônica que lhe confere uma excelente penetração através dos canais de porina específicos (OprD<sub>2</sub>), boa estabilidade às  $\beta$ -lactamases e forte ligação a PBPs essenciais. São resistentes às  $\beta$ -lactamases da classe A, C e D de Ambler, incluindo BLSE (Sousa J. *et al.*, 2016).

A emergência de resistências a nível mundial limita gravemente as opções terapêuticas e trata-se de um problema de saúde pública (Baeza L. *et al.*, 2019).

A resistência aos carbapenemos por parte das *Enterobacteriales* emergiu por todo o mundo, destacando-se a sua rápida e progressiva disseminação. Esta família inclui microrganismos que se encontram na natureza e em produtos biológicos, dado que são membros constituintes do microbioma normal dos órgãos humanos, como o trato gastrointestinal. (Lavagnoli S. *et al.*, 2017).

Nos últimos tempos, a maior preocupação dos serviços de saúde e do serviço público, são as resistências aos carbapenemos por parte da família *Enterobacteriales*, bactérias gram-negativas, uma vez que, estes antibióticos são considerados de última linha apresentando atividade antibacteriana de amplo espetro (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

Para limitar a disseminação das estirpes produtoras de carbapenemases (CPE), a sua identificação rápida é de extrema importância em termos epidemiológicos e de controlo da infeção (Bonomo R. *et al.*, 2018).

### **1.1. Mecanismo de ação dos betalactâmicos**

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibem a síntese da parede celular das bactérias através da ligação irreversível com as PBPs. Esta ligação impede interações interpeptídicas entre as cadeias peptídicas, deixando de haver formação do peptidoglicano (principal constituinte da parede celular bacteriana e estrutura rígida que fornece estabilidade osmótica) (Calisto F., 2011). A sua falta permite a entrada de água para o interior da bactéria, provocando a sua lise. A inibição da síntese da parede celular promove a ativação do sistema autolítico, desencadeando a morte do microrganismo e por isso estes antibióticos designam-se por bactericidas (Letourneau A., 2017).

Apesar do mecanismo de ação ser bastante eficiente, existem bactérias deficientes nessas enzimas autolíticas ou que apresentam mutações nos genes responsáveis pela característica, tornando-as tolerantes aos  $\beta$ -lactâmicos (Letourneau A., 2017).

### **1.2. Mecanismos de resistência**

A resistência bacteriana é um mecanismo de defesa dos microrganismos, de forma a tolerar os efeitos dos antibióticos (Chuquisapon M., 2018). Essa resistência é conseguida através de quatro mecanismos que envolvem as bombas de efluxo, impermeabilização da membrana externa, modificação dos alvos (PBP) e hidrólise enzimática dos  $\beta$ -lactâmicos por  $\beta$ -lactamases (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

Os antibióticos para desempenharem a sua ação têm de penetrar a parede celular bacteriana e acilar os PBPs, o que exige a integridade do anel  $\beta$ -lactâmico. A permeação da parede celular das bactérias Gram positivas e Gram negativas ocorre por diferentes mecanismos. Nas Gram positivas, a parede celular é uma monocamada justaposta à membrana celular, sendo a célula praticamente sem periplasma. Na maioria dos casos esta parede é permeável a macromoléculas e de um modo geral não aparece resistência à difusão dos antibióticos (Sousa J., 2005).

No geral, as bactérias Gram negativas apresentam resistências a um maior número de antimicrobianos do que as Gram positivas, visto que, existem diferenças na parede celular, reduzida permeabilidade da membrana externa e devido à presença de bombas de efluxo (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

#### **1.2.1. Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo são mecanismos de resistência intrínseca, utilizadas pelas bactérias para remover substâncias nocivas do seu interior para o exterior. Em situações de resistências, as bactérias apresentam essas bombas sobre expressas, o que dificulta a acumulação intrínseca dos antibióticos de modo a provocar a sua morte (Codjoe F. and Donkor E., 2017). De acordo com a sua sequência de aminoácidos, as bombas de efluxo são agrupadas em 5 famílias, a família Major Facilitator Superfamily (MFS), a família ATB-Binding Cassete (ABC), a família Small Multidrug Resistance (SMR), a família Resistance-Nodulation-Division (RND) e a família Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE). Nas bactérias Gram positivas predomina a

família MFS enquanto que nas Gram negativas o sistema de transporte dominante é o RND e o MATE.

### 1.2.2. Impermeabilidade da membrana externa

Geralmente nas bactérias Gram negativas, os  $\beta$ -lactâmicos conseguem penetrar a membrana externa recorrendo a canais de porinas e alcançar o espaço periplasmático e a membrana plasmática (Letourneau A., 2017).

Existem microrganismos que possuem uma permeabilidade da membrana reduzida porque possuem mutações nas porinas ou a sua expressão diminuída, reduzindo a absorção e entrada dos antibióticos para o seu interior (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

### 1.2.3. Modificação dos alvos (PBPs)

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuam ao nível das PBPs, uma vez que, é a partir da sua acilação que conseguem inibir a formação do peptidoglicano e por sua vez induzir a lise bacteriana. Quando ocorrem mutações nos genes responsáveis pelas PBPs, recombinações homólogas entre os genes ou síntese de novos alvos sem afinidade para com os  $\beta$ -lactâmicos, surgem as estirpes resistentes (Sousa J., 2005).

### 1.2.4. Hidrólise enzimática

O principal mecanismo de resistência das bactérias é a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que são capazes de hidrolisar os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Podem ser codificadas no cromossoma bacteriano, sendo característica de uma espécie ou mediadas por um plasmídeo, passando a caracterizar apenas uma estirpe individual (Letourneau A., 2017).

As  $\beta$ -lactamases produzidas por bactérias Gram positivas são excretadas para o meio ambiente enquanto que nas Gram negativas ficam no periplasma, daí a resistência aos carbapenemos se manifestar mais em bactérias Gram negativas.

A resistência aos carbapenemos pode ser desenvolvida devido à hiperprodução de  $\beta$ -lactamases AmpC ou BLSEs combinadas com permeabilidade alterada da membrana externa ou pela produção de carbapenemases (um tipo de  $\beta$ -lactamases) (Baeza L. *et al.*, 2019).

## 1.3. Classificação das carbapenemases

De modo a facilitar a identificação das carbapenemases, foram organizadas segundo a homologia dos aminoácidos no qual atuam, seguindo o sistema de classificação molecular Ambler. São classificadas em 4 classes (A, B, C e D) em que as classes A, B e D possuem maior importância clínica (Quale J. and Spelman D., 2019).

### 1.3.1. Classe A

As  $\beta$ -lactamases da classe A para desempenharem o seu mecanismo hidrolítico, requerem resíduos de serina no centro ativo. Incluem enzimas que não são capazes de hidrolisar os carbapenemos, como as penicilinas e as cefalosporinas (do tipo TEM, SHV e CTX-M), e as enzimas com atividade de  $\beta$ -lactamase, que inclui as carbapenemases. As  $\beta$ -lactamases da classe A com atividade de carbapenemase podem ser codificadas em cromossomas, como por exemplo a enzima de *Serratia marcescens* (SME), não-metaloenzima carbapenemases (NMC) e a  $\beta$ -lactamase que hidrolisa o imipenem (IMI) e em plasmídeos, tal como a carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) e a Guiana de espectro estendido (GES). A GES foi descrita para a *P.aeruginosa* e *K.pneumoniae* (Quale J. and Spelman D., 2019).

A carbapenemase mais importante da classe A é a KPC porque revela maior importância a nível clínico uma vez que reside em plasmídeos facilmente transmissíveis a outros géneros de bactérias, incluindo *E.coli*, *P.aeruginosa*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Serratia* e *Enterobacter spp* e confere resistência à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos. (Quale J. and Spelman D., 2018). Esta enzima hidrolisa diversos  $\beta$ -lactâmicos, tal como, penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos, não sendo inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (Porreca A. *et al.*, 2018). Foram identificadas diversas variantes de KPC que apresentam diferentes graus de hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos, o que contribui para perfis de suscetibilidade variáveis quando testados *in vitro* (Quale J. and Spelman D., 2019).

### 1.3.2. Classe B

Esta classe é conhecida por metalo-betalactamase (MBL) porque dependem do zinco para efetuar a hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos e por esta razão são inibidas pelo EDTA, agente quelante de catiões (Quale J. and Spelman D., 2019).

A primeira MBL identificada foi a Imipenemase Metalobetalactamase (IMP-1) e depois surgiram a Verona *Integron-encoded* Metalobetalactamase (VIM), a Imipenemase alemã (GIM), a Metalobetalactamase de São Paulo (SPM) e a Imipenemase Seoul (SIM).

Existem dois tipos de MBLs, as adquiridas (codificadas de genes residentes em plasmídeos) e as que ocorrem naturalmente (codificadas em cromossomas). As MBLs de ocorrência natural foram descritas em *Aeromonas hydrophilia*, *Chryseobacterium spp* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Quale J. and Spelman D., 2019).

Posteriormente surgiu a Nova Deli metalo-betalactamase (NDM-1), que é um tipo de MBL cujo gene que a codifica está situado num elemento de DNA móvel, o que torna a sua disseminação imprevisível. Esta enzima foi isolada de *Enterobacteriales* e não *Enterobacteriales* como o *Acinetobacter* (Quale J. and Spelman D., 2019).

### 1.3.3. Classe D

As  $\beta$ -lactamases da classe D são também conhecidas por enzimas do tipo oxacilinase (OXA) uma vez que demonstram capacidade em hidrolisar a oxacilina (Quale J. and Spelman D., 2019). Trata-se de um grupo heterogéneo (com mais de 100 enzimas) e devido à sua atividade hidrolítica variável sobre os carbapenemos, são divididas em 6 subgrupos, nomeadamente a OXA-23, OXA-24 / OXA40, OXA-48, OXA-58, OXA-143, e OXA-51 (Albin O. *et al.* 2018). São transmitidos por plasmídeos, com exceção da OXA-51 que é cromossómica (Quale J. and Spelman D., 2019).

As OXA são mais frequentes no *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacteriales* (especialmente *E.coli*, *K.pneumoniae* e *E.cloacae*). Enquanto a maioria dos isolados de *A. baumannii* com OXA-23, OXA-24/OXA-40 ou OXA-58 são resistentes aos carbapenemos, as *Enterobacteriales* com enzimas do tipo OXA-48 têm suscetibilidades variáveis aos carbapenemos (Quale J. and Spelman D., 2019).

À semelhança das carbapenemases da classe A, também estas necessitam do aminoácido serina no seu centro ativo (Quale J. and Spelman D., 2019).

Uma vasta maioria de isolados resistentes aos carbapenemos apresenta resistências adicionais às fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª geração e aminoglicosídeos (European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union. Stockholm: ECDC; 2016). Para além disso, possuem aptidão para partilhar os plasmídeos de resistência entre espécies, favorecendo a emergência de estirpes resistentes (PPCIRA, 2017).

| Ambler Structural Class | Functional Class <sup>a</sup> | Active Site <sup>b</sup> | Inhibitor(s)   | Notable Gene <sup>c</sup> |
|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|--|---------------------------|
| A                       | 2f                            | Serine                   | Commercially available $\beta$ -lactamase inhibitors | KPC<br>GES                |
| B                       | 3                             | Zinc                     | Metal-chelating agents (eg, EDTA)                    | VIM<br>IMP<br>NDM         |
| D                       | 2d                            | Serine                   | NaCl (in vitro)                                      | OXA-48<br>OXA-181         |

**Figura 2** - Divisão das  $\beta$ -lactamases segundo classificação molecular e funcional (Adaptado de Logan L. and Weinstein R., 2017).

#### 1.4. Epidemiologia

Os carbapenemos são  $\beta$ -lactâmicos com atividade antibacteriana de largo espectro e a sua estrutura única proporciona defesas contra a maioria das lactamases, tais como AmpC e BLSEs. (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

A rápida disseminação das resistências aos carbapenemos tem vindo a constituir cada vez mais uma preocupação para a saúde pública, visto que, são antibióticos de última linha no tratamento de infeções bacterianas e as estirpes resistentes têm aparecido em quase todos os cantos do mundo, tal como se pode visualizar na figura 3 (Codjoe F. and Donkor E., 2017; Leitão I., 2014).

A primeira carbapenemase a ser descoberta foi a MBL IMP-1, no Japão em 1991, numa estirpe de *P.aeruginosa* (Quale J. and Spelman D., 2019). As VIM foram identificadas de isolados de *P.aeruginosa* em 1996 (Verona-Itália) e 1997 (Marselha-França). Em 2001, começaram a aparecer na Grécia, tornando-se o país central das VIM, embora posteriormente tenham sido identificadas noutros países europeus (Logan L. and Weinstein R., 2017). A SPM-1 foi descoberta em São Paulo no ano 1997 e a GIM-1 na Alemanha em 2002, ambas isoladas de uma estirpe de *P.aeruginosa* (El Salabi A. *et al.*, 2009; Wendel A. *et al.*, 2013). A SIM-1 foi identificada na Coreia, mais concretamente Seul, numa estirpe de *Acinetobacter baumannii* (Lee K. *et al.*, 2005).

O isolamento de *Enterobacteriales* portadoras de MBL codificadas num gene móvel cujo primeiro caso foi detetado numa *K.pneumoniae* isolada num doente sueco hospitalizado em Nova Deli e que foi descrito pela primeira vez em Dezembro de 2009, trouxe preocupação acrescida. Este tipo de MBL (NDM) tem facilidade em espalhar-se a nível ambiental, sobretudo nos cursos de água, havendo mesmo um estudo realizado na Índia em 2011 que indicou que cerca de 30% da água estava contaminada por este tipo de estirpes. A NDM surge na maioria das regiões em situações esporádicas (Logan L. and Weinstein R., 2017).

A KPC, detetada em 1996 nos Estados Unidos a partir de *K.pneumoniae*, é natural de países europeus, como Itália e Grécia e responsável por um elevado número de surtos em todo o mundo (Bonomo R. *et al.*, 2018). Em Portugal, até 2015, apenas se verificaram surtos hospitalares esporádicos (Coutinho T., 2018). Em 1998 e em Maryland, foi isolada uma *Salmonella spp* a partir de uma amostra de fezes de uma criança com gastroenterite, portadora de uma carbapenemase do tipo KPC (Porreca A. *et al.*, 2018).

A disseminação mundial das OXA deve-se principalmente á OXA-48, descoberta em 2001 na Turquia, isolada de *K.pneumoniae* (Logan L. and Weinstein R., 2017). A partir dessa altura, têm sido reportados novos casos na Europa, Médio Oriente, Índia e Norte de África (Leitão I., 2014). De acordo com o ECDC, desde 2007 a incidência de infeções desencadeadas por *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos tem vindo a aumentar (Leitão I., 2014). As estirpes de *K.pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC e resistentes à colistina originam infeções capazes de provocar a morte a 51% dos doentes, conduzindo a elevadas taxas de mortalidade (Bush K., 2018).

Em 2010, a incidência de *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos foi de 4,6%, em que a maioria dos casos ocorreu na Grécia (49,1%), Itália (15,2%), Hungria (5,5%) e Chipre (16,4%). Quanto a Portugal, a percentagem foi de 1,4% (*European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC; 2014).

No ano seguinte, a sua incidência na Europa aumentou para 5,8%, sendo os países já anteriormente mencionados os mais afetados. Em Portugal, a percentagem diminuiu para 0,3%. Estes valores indicavam um aumento crescente nas resistências a nível europeu (*European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*). Stockholm: ECDC; 2014).

Em 2012, a ocorrência na Europa aumentou para 6,2%, em que a maioria dos surtos apareceram na Grécia (60,5%) e Itália (29,1%). Já em Portugal, a percentagem aumentou para 0,7%. Nesse ano, começaram a surgir estirpes de *Escherichia coli* também com resistências aos carbapenemos, representando cerca de 0,1% dos casos em Portugal e na Europa. (*European Centre for Disease Prevention and Control. Summary of the latest data on antibiotic resistance in the European Union*. Stockholm: ECDC; 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou em 2014 que a resistência aos carbapenemos em estirpes de *K.pneumoniae* se alastrou por todo o mundo (Porreca A. *et al.*, 2018). Nos últimos dez anos, a resistência aos carbapenemos tem origem maioritariamente em *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases do tipo KPC e MBL (Ibrahim Y. *et al.*, 2017).

Do ano 2014 para 2015, a percentagem de *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos em Portugal aumentou de 1,8% para 3,4%. Até 2017 continuou a verificar-se um aumento, atingindo uma incidência de 8,6%. Relativamente a *E.coli* resistentes aos carbapenemos, a sua incidência em Portugal entre 2014 e 2016, rondou os 0,1%, aumentando para 0,3% no ano 2017 (*European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017*. Stockholm: ECDC; 2018).

No ano 2017, a Rede Europeia de Vigilância da Resistência Antimicrobiana (EARS-Net) constatou que Portugal se encontra numa situação bastante preocupante no que se refere a resistências antimicrobianas. O número de isolamentos de *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases tem sido crescente, havendo um aumento relevante nas resistências às fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª geração, aminoglicosídeos e carbapenemos, quer isoladamente quer em associação (Coutinho T., 2018).

O aumento das resistências preocupa justificadamente todas as estruturas de prevenção e controlo das infeções associadas aos cuidados de saúde e das resistências aos antimicrobianos, uma vez que, apesar de existirem inúmeros exemplos de boas práticas e recomendações europeias e mundiais acessíveis a todos, continua a existir um número significativo de instituições inconscientes para a gravidade deste problema (PPCIRA, 2017).

Dado que a epidemiologia de *K.pneumoniae* portadoras de KPC é a mais significativa, houve a necessidade de desenvolver uma terapia capaz de combater as infeções provocadas pelas mesmas. A combinação da ceftazidima, cefalosporina de 3ª geração, com avibactam, inibidor de β-lactamases, tem demonstrado grande eficácia quer para KPC quer para OXA-232 (Zhang W. *et al.*, 2018).

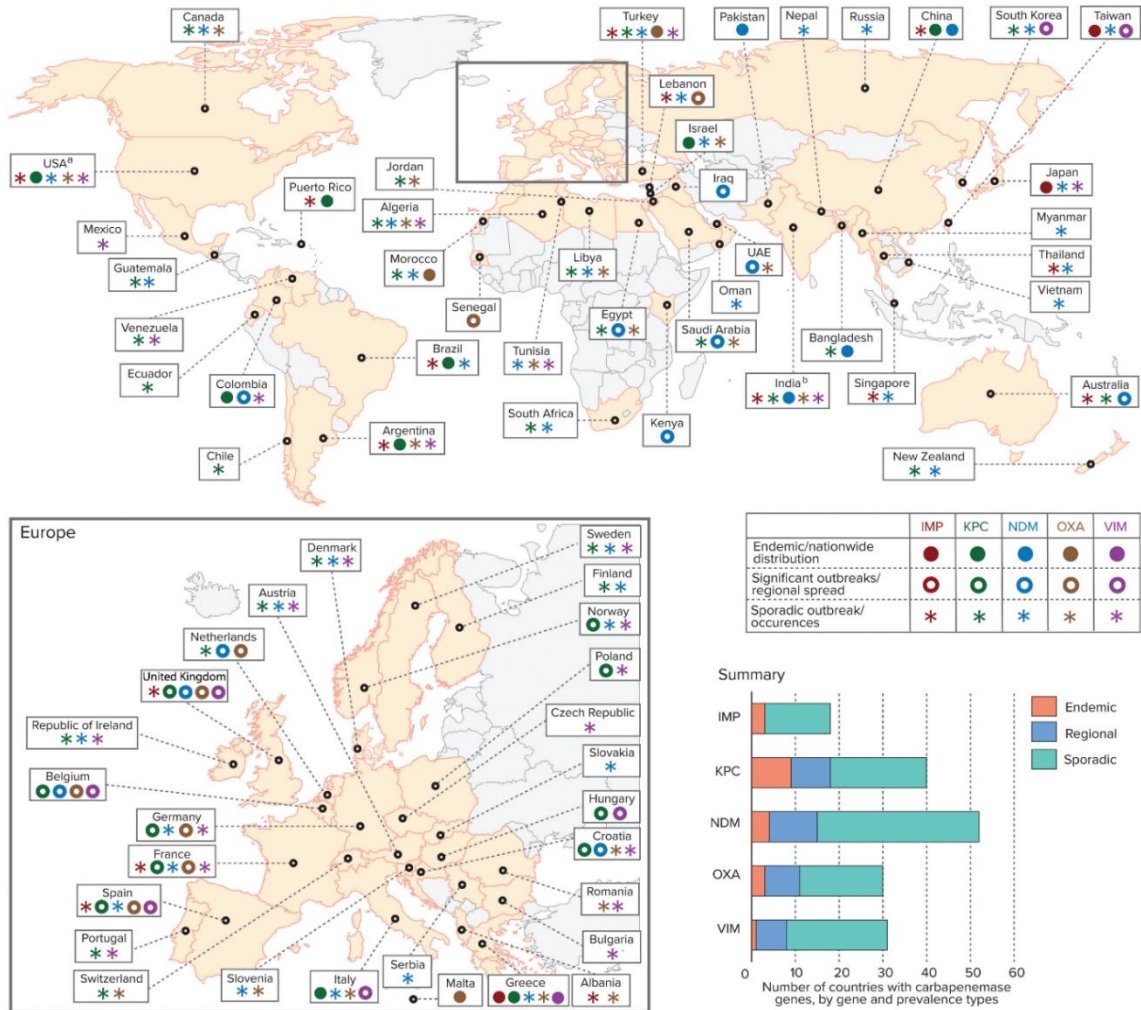


Figura 3 - Distribuição global das resistências bacterianas aos carbapenemos (Logan L. and Weinstein R., 2017).

### 1.5. Fatores de risco

Os carbapenemos são antimicrobianos de largo espectro usados no tratamento de doenças invasivas ou que impliquem risco de vida devido ao seu efeito bactericida, independente da concentração de bactérias presentes (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

Existem diversos fatores que predisõem as pessoas a infecções provocadas por organismos resistentes. A exposição a estes organismos, juntamente com determinados fatores de risco, pode desencadear infecções graves nos doentes (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

O estudo destes fatores nas infecções provocadas por bactérias resistentes tem vindo a desempenhar um papel cada vez mais importante, dado que, contribui para melhorar a eficácia terapêutica e o controlo da disseminação (Jiao Y. *et al.*, 2015).

Alguns dos fatores de risco associados à colonização por bactérias resistentes aos carbapenemos são nomeadamente a exposição prévia a antibióticos (carbapenemos, quinolonas e cefalosporinas de 3<sup>a</sup> geração), uso de dispositivos invasivos (cateteres e algalias), internamento em unidades de cuidados intensivos, internamento hospitalar prolongado, uso de ventilação mecânica, imunossupressão, outras doenças e a idade (Codjoe F. and Donkor E., 2017; Porreca A. *et al.*, 2018). Para além destes fatores, existem outros que propiciam as infecções, os quais estão referidos na tabela 1.

Os hospitais são o principal foco de bactérias e por este motivo um doente que permaneça internado durante muito tempo está sujeito a uma maior exposição e consequentemente maior risco de infeção (Ling M. *et al.*, 2015).

Também o internamento prolongado em unidades de cuidados intensivos favorece a disseminação das estirpes resistentes. Neuner e os seus colaboradores relataram que a readmissão de doentes, no hospital de Ohio, com infeções na corrente sanguínea desencadeada por *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos era de 72% nestes doentes (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

O elevado potencial de disseminação das bactérias resistentes em ambientes hospitalares torna fundamental a implementação de medidas preventivas, como diminuir o tempo de internamento e aumentar a vigilância de doentes cirúrgicos (Lavagnoli L. *et al.*, 2017).

A exposição prévia ou contínua de antibióticos de amplo espectro contribui para a destruição da flora normal (que em situações saudáveis se encontra em equilíbrio), havendo seleção das estirpes presentes e favorecendo a sobrevivência das bactérias resistentes (Mariappan S. *et al.*, 2017). O uso irracional de antibióticos em países em desenvolvimento, como África, contribui para o aumento do risco de infeções provocadas por *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos. Estas infeções associadas aos cuidados de saúde são principalmente causadas por *K.pneumoniae* e são encontradas em situações de pneumonias associadas à utilização de ventiladores, bacteremias e infeções do trato urinário e do local cirúrgico (Codjoe F. and Donkor E., 2017).

Relativamente à utilização de dispositivos, estes causam lesões ao nível do trato respiratório ou da mucosa gastrointestinal, que são exemplos de barreiras protetoras. Quando ocorre lesão, estas deixam de exercer a sua função, provocando debilidade e aumentando a possibilidade de colonização por bactérias (Jiao Y. *et al.*, 2015; Porreca A. *et al.*, 2018)

A utilização prolongada de ventilação mecânica contribui para uma expectoração seca e pegajosa, aumentando a probabilidade de desenvolver infeções ou lesões pulmonares. Portanto, tudo que interfira com a função fisiológica das barreiras protetoras aumenta o risco de colonização (Ang H. and Sun X., 2018).

Indivíduos com doenças, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e doenças malignas, ou que estão expostos a agentes imunossupressores apresentam as suas defesas mais debilitadas e conseqüentemente são mais suscetíveis a risco de infeção (Ang H. and Sun X., 2018).

A idade é também um importante fator a ter em conta, pois indivíduos com mais idade são mais vulneráveis e por isso mais propícios ao aparecimento de infeções bacterianas (PPCIRA, 2017).

**Tabela 1** - Fatores de risco associados às infeções provocadas pelas CPE (Ling M. *et al.*, 2015).

| Risk factors  | CP-CRE patients<br>(N = 203)<br>n (%) | Control<br>(N = 203)<br>n (%) | X = value/Mann-Whitney U<br>(p-value/Fisher Exact) | Odds Ratio<br>[95 % CI]         |
|---|---------------------------------------|-------------------------------|--|---------------------------------|
| Total length of stay ± SD<br>(days)<br>(mean days 95 % confidence interval) | 48.0 ± 59.5<br>(39.8–56.3)            | 3.9 ± 3.8<br>(3.4–4.5)        | U: 3223<br>(<0.001)                                | 1.266 [1.197–1.340]<br>(<0.001) |
| History of previous overseas hospitalisation                                | 29 (14.3 %)                           | 1 (0.5 %)                     | 28.218 (<0.001)**                                  | 33.667 [4.539–259.700]          |
| History of travelling in past 90 days                                       | 29 (14.3 %)                           | 15 (7.4 %)                    | 4.996 (0.025)*                                     | 2.089 [10.834.028]              |
| Ambulant on arrival   | 103 (50.7 %)                          | 153 (75.4 %)                  | 26.432 (<0.001)**                                  | 0.337 [0.221–0.513]             |
| Admission to CU   | 54 (26.6 %)                           | 6 (3.0 %)                     | 45.059 (<0.001)**                                  | 11.899 [4.986–28.399]           |
| Mean ICU stay ± SD, day<br>(mean days 95 % confidence interval)             | 9.6 ± 12.2<br>(6.3–13.0)              | 1.2 ± 1.0<br>(0.1–2.2)        | U: 46.0 (<0.004)**                                 | -                               |
| Admission to HD/ICA   | 106 (52.2 %)                          | 29 (14.3 %)                   | 65.797 (<0.001)**                                  | 6.557 [4.057–10.596]            |
| Mean HD/ICA stay ± SD, day<br>(mean days 95 % confidence interval)          | 5.3 ± 6.1<br>(4.1–6.5)                | 2.0 ± 1.7<br>(1.4–2.7)        | 9.0 (0.372)  | -                               |
| Cardiovascular disease comorbidity  | 105 (51.7 %)                          | 74 (36.5 %)                   | 9.602 (0.002)**                                    | 1.868 [1.256–2.778]             |
| Diabetes mellitus comorbidity   | 67 (33.0 %)                           | 58 (28.6 %)                   | 0.936 (0.333)                                      | 1.232 [0.807–1.870]             |
| Malignancy comorbidity  | 57 (28.1 %)                           | 41 (20.2 %)                   | 3.443 (0.064)                                      | 1.543 [0.974–2.442]             |
| Immunodeficiency comorbidity  | 10 (4.9 %)                            | 2 (1.0 %)                     | 5.496 (0.019)*                                     | 5.207 [1.126–24.072]            |
| Haematology comorbidity   | 20 (9.9 %)                            | 5 (2.5 %)                     | 9.591 (0.002)**                                    | 4.328 [1.592–11.769]            |
| Exposure to DXT   | 23 (11.3 %)                           | 11 (5.4 %)                    | 4.622 (0.032)*                                     | 2.230 [1.057–4.706]             |
| Exposure to steroid   | 34 (16.7 %)                           | 12 (5.9 %)                    | 11.866 (0.001)**                                   | 3.202 [1.606–6.384]             |
| Exposure to chemotherapy  | 15 (7.4 %)                            | 16 (7.9 %)                    | 0.035 (0.852)                                      | 0.933 [0.448–1.941]             |
| Exposure to penicillin antibiotics  | 33 (16.3 %)                           | 7 (3.4 %)                     | 18.747 (<0.001)**                                  | 5.435 [2.344–12.604]            |
| Exposure to β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations antibiotics         | 122 (60.1 %)                          | 59 (29.1 %)                   | 39.568 (<0.001)**                                  | 3.676 [2.432–5.557]             |
| Exposure to cephalosporin antibiotics                                       | 65 (32.0 %)                           | 43 (21.2 %)                   | 6.106 (0.013)*                                     | 1.753 [1.120–2.742]             |
| Exposure to carbapenems antibiotics   | 62 (30.5 %)                           | 5 (2.5 %)                     | 58.077 (<0.001)**                                  | 17.413 [6.826–44.417]           |
| Exposure to fluoroquinolones antibiotics                                    | 35 (17.2 %)                           | 19 (9.4 %)                    | 5.468 (0.019)*                                     | 2.018 [1.111–3.663]             |
| Exposure to glycopeptide antibiotics  | 69 (34.0 %)                           | 4 (2.0 %)                     | 70.564 (<0.001)**                                  | 25.618 [9.132–71.865]           |
| Exposure to metronidazole antibiotics                                       | 36 (17.7 %)                           | 15 (7.4 %)                    | 9.889 (0.002)**                                    | 2.702 [1.428–5.110]             |
| Exposure to aminoglycosides antibiotics                                     | 17 (8.4 %)                            | 1 (0.5 %)                     | 14.882 (<0.001)**                                  | 18.462 [2.433–140.097]          |
| Presence of central line device   | 80 (39.4 %)                           | 11 (5.4 %)                    | 67.433 (<0.001)**                                  | 11.353 [5.811–22.179]           |
| Presence of urinary catheter device   | 86 (42.4 %)                           | 30 (14.8 %)                   | 37.842 (<0.001)**                                  | 4.239 [2.630–6.831]             |
| Presence of ETT device  | 42 (20.7 %)                           | 6 (3.0 %)                     | 30.620 (<0.001)**                                  | 8.565 [3.551–20.658]            |
| Presence of intra-arterial line device                                      | 24 (11.8 %)                           | 5 (2.5 %)                     | 13.406 (<0.001)**                                  | 5.309 [1.984–14.211]            |
| Presence of drains device   | 31 (15.3 %)                           | 11 (5.4 %)                    | 10.623 (0.001)**                                   | 3.146 [1.534–6.450]             |
| Presence of enteral feeding device  | 49 (24.1 %)                           | 11 (5.4 %)                    | 28.240 (<0.001)**                                  | 5.554 [2.793–11.044]            |
| Presence of additional MRSA   | 47 (23.2 %)                           | 26 (12.8 %)                   | 7.365 (0.007)**                                    | 2.051 [1.213–3.468]             |
| Presence of additional VRE  | 32 (15.8 %)                           | 5 (2.5 %)                     | 21.678 (<0.001)**                                  | 7.411 [2.825–19.441]            |
| Exposure to bronchoscopy procedure  | 22 (10.8 %)                           | 4 (2.0 %)                     | 13.314 (<0.001)**                                  | 6.047 [2.045–17.881]            |
| Exposure to gastroscopy procedure   | 18 (8.9 %)                            | 10 (4.9 %)                    | 2.455 (0.117)                                      | 1.878 [0.845–4.175]             |
| Exposure to colonoscopy procedure   | 4 (2.0 %)                             | 6 (3.0 %)                     | 0.410 (0.522)                                      | 0.660 [0.183–2.375]             |
| Exposure to angiogram procedure   | 9 (4.4 %)                             | 6 (3.0 %)                     | 0.623 (0.430)                                      | 1.523 [0.532–4.361]             |
| Underwent surgery   | 141 (69.5 %)                          | 146 (71.9 %)                  | 0.297 (0.586)                                      | 1.126 [0.734–1.727]             |

\**p* < 0.05 (Significance of association; 2-tailed), \*\**p* < 0.01 (Significance of association; 2-tailed)

## 1.6. Métodos de deteção

A presença de carbapenemases é de grande relevância clínica, como tal, é necessário a rápida deteção do microrganismo possuidor de resistências a antibióticos, pois é essencial na decisão terapêutica, no controlo da infeção e no impedimento da sua transmissão. Devido à elevada diversidade de carbapenemases e à variabilidade do seu perfil fenotípico de suscetibilidade aos antibióticos, a sua deteção torna-se um grande desafio (Bonomo R. *et al.*, 2018).

Os métodos utilizados para detetar estas enzimas são repartidos em dois grupos, particularmente em fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos caracterizam-se por detetar a produção de carbapenemases. Os métodos genotípicos são testes confirmatórios que oferecem informação adicional através da deteção do gene responsável pela resistência, sendo o método mais usado a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Davoudi-Monfared E. and Khalili H., 2018).

Numa fase inicial, os meios cromogénicos seletivos são uma excelente opção no screening de bactérias com alto nível de resistência aos carbapenemos (Rodríguez-Baño J. *et al.*, 2015). Algumas das desvantagens na utilização destes meios consistem no facto de não se aplicarem às bactérias com reduzida expressão fenotípica uma vez que a coloração das colónias é pouco perceptível. Para além disso, a cor das colónias provenientes destes meios interferem com testes colorimétricos que são necessários efetuar posteriormente (Sahuquillo-Arce J. *et al.*, 2015).

Após a deteção de sensibilidade reduzida aos carbapenemos a partir do teste de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) usado na rotina laboratorial, efetuam-se os testes fenotípicos. Os principais métodos fenotípicos utilizados são o teste de combinação de discos (CDT), testes colorimétricos, método de inativação do carbapenemo (CIM), MALDITOF e ensaios de fluxo lateral (LFIA).

O CDT consiste na utilização de discos que contêm um carbapenemo e inibidores de  $\beta$ -lactamases. Alguns desses inibidores podem ser o ácido borónico, que inibe as carbapenemases de classe A, o EDTA e o ácido dipicolínico inibem a classe B, quanto à OXA-48 e à KPC são inibidas pelo avibactam (Davoudi-Monfared E. and Khalili H., 2018). A desvantagem deste método consiste na necessidade de incubação de 18 horas, razão pelo qual se opta por testes mais rápidos. O teste modificado de Hodge (MHT) está incluído neste método, mas não é recomendado como teste de rotina devido à dificuldade de interpretação e fraca especificidade e sensibilidade (Giske C. *et al.*, 2017).

Nos testes colorimétricos onde se inclui o RAPIDEC® CARBA NP, um teste rápido (<2 horas), que se baseia na diminuição do pH em consequência à hidrólise do carbapenemo (imipenem) por carbapenemases produzidas por bactérias. Ocorre alteração de cor de vermelho para amarelo, devido à presença do vermelho fenol como indicador (Dortet L. *et al.*, 2012). Este teste deteta

a maioria das carbapenemases, à exceção da OXA-48, onde manifesta menor sensibilidade, podendo haver falsos negativos, uma vez que, esta enzima é menos eficaz na hidrólise (Tamma P. and Simner P., 2018). A utilização do teste foi também estendida para a identificação precoce de estirpes resistentes aos carbapenemos em hemoculturas positivas, antes do seu isolamento em meio sólido (Bonomo R. *et al.*, 2018). O RAPIDEC® CARBA NP é um teste que pode auxiliar as unidades de saúde na redução e na implementação de medidas rápidas de contenção, de modo a minimizar a disseminação destas estirpes produtoras de carbapenemases (Codjoe F. and Donkor E., 2017). O teste Blue-Carba (BCT) e o teste B Carba™ são derivados do teste anterior que apresentam mudanças, nomeadamente nos indicadores de pH, de modo a aumentar a capacidade de deteção das carbapenemases do tipo OXA-48 (Noël A. *et al.*, 2017; Pasteran F. *et al.*, 2015),

O CIM baseia-se na hidrólise enzimática do carbapenemo (meropenemo) quando incubado com uma suspensão bacteriana (Yamada K. *et al.*, 2016). Se não existir um halo em torno do disco, significa que há produção de carbapenemase, caso contrário, o meropenemo conserva a sua atividade e por isso o microrganismo não é produtor da enzima. A deteção de carbapenemases com atividade hidrolítica reduzida (como o tipo OXA) e a necessidade de incubação de pelo menos 18 h são as suas principais limitações (Tamma P. and Simner P., 2018).

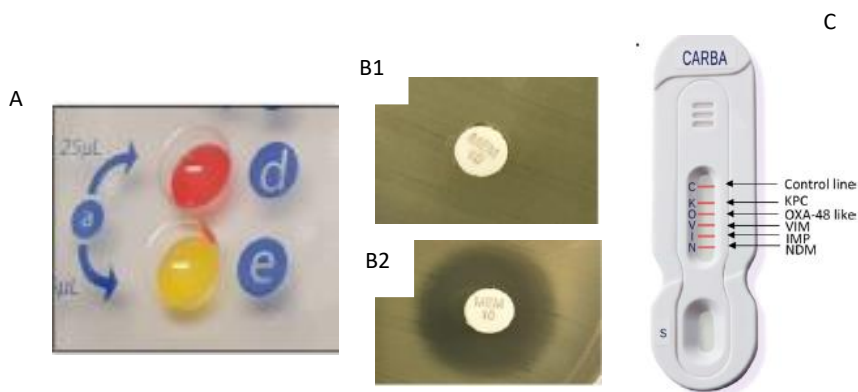
O MALDITOF é um equipamento de espectrometria de massa capaz de identificar rapidamente os produtos de degradação do carbapenemo através da diminuição ou desaparecimento de picos específicos dos carbapenemos. Os extratos de proteínas bacterianas são incubados com um substrato do antibiótico, cuja estrutura é quebrada, alterando a sua massa (Codjoe F. and Donkor E., 2017). Neste caso, as proteínas bacterianas que conferem resistências são bastante complexas, desempenhando um grande desafio para a deteção por este equipamento. (Ghebremedhin B. *et al.*, 2016). A sua principal desvantagem é a necessidade de alterar as configurações do equipamento em relação à configuração usada para a identificação de espécies bacterianas (Papagiannitsis C. *et al.*, 2015).

Relativamente aos LFIA, são técnicas rápidas baseadas em ensaios imunocromatográficos que permitem a identificação direta da enzima presente (Pasteran F. *et al.*, 2016; Tamma P. and Simner P., 2018).

Na rotina do laboratório de análises clínicas da ULS - Guarda, primeiramente procede-se à identificação do microrganismo presente na amostra e o TSA através de sistemas automatizados (ex. VITEK® 2). É necessário confirmar as resistências e caso existam suspeitas da presença de carbapenemases efetuam-se outros testes complementares, como RAPIDEC® CARBA NP e E-teste (nomeadamente do ertapenemo e do meropenemo). Em situações em que as bactérias apresentam múltiplas resistências, realiza-se também a determinação da concentração mínima inibitória (MIC) por E-teste da ceftazidima-avibactam, a determinação da MIC da colistina por microdiluição e nalgumas situações específicas a determinação da MIC da tigeciclina por E-teste, de modo a obter alternativas terapêuticas.

O E-teste consiste em tiras impregnadas com gradiente de concentração de um antibiótico predefinido (neste caso ertapenemo e meropenemo), que de acordo com o procedimento padronizado e com as normas definidas pelo Comité Europeu sobre testes de suscetibilidade antimicrobiana (EUCAST) permite a determinação da MIC.

Os métodos genotípicos permitem a identificação e diferenciação de sequências genéticas responsáveis pela resistência aos carbapenemos, sendo os mais utilizados o PCR e a técnica de microarray. O PCR é um procedimento bastante rápido (4-6 h) e apresenta excelente especificidade e sensibilidade. O PCR em tempo real é uma técnica que possibilita a deteção de sequências-alvo em amostras simples ou complexas e é efetuada na rotina laboratorial uma vez que reduz o tempo de deteção (Sahuquillo-Arce J. *et al.*, 2015). A tecnologia microarray facilita a identificação de múltiplos genes de resistência através da hibridação das sequências bacterianas com as sondas fixas num suporte sólido (Stuart J. *et al.*, 2012). Algumas das desvantagens destas técnicas são o alto custo e a incapacidade de detetar novos genes de carbapenemases visto que apenas permite identificar os genes mais prevalentes (Sahuquillo-Arce J. *et al.*, 2015).



**Figura 4** - A- RAPIDEC® CARBA NP; B - CIM, B1- Resultado positivo para a presença de carbapenemase; B2- Resultado negativo; C - Imunoensaios de fluxo lateral com as diversas carbapenemases (Adaptado de Tamma P. and Simner P., 2018).

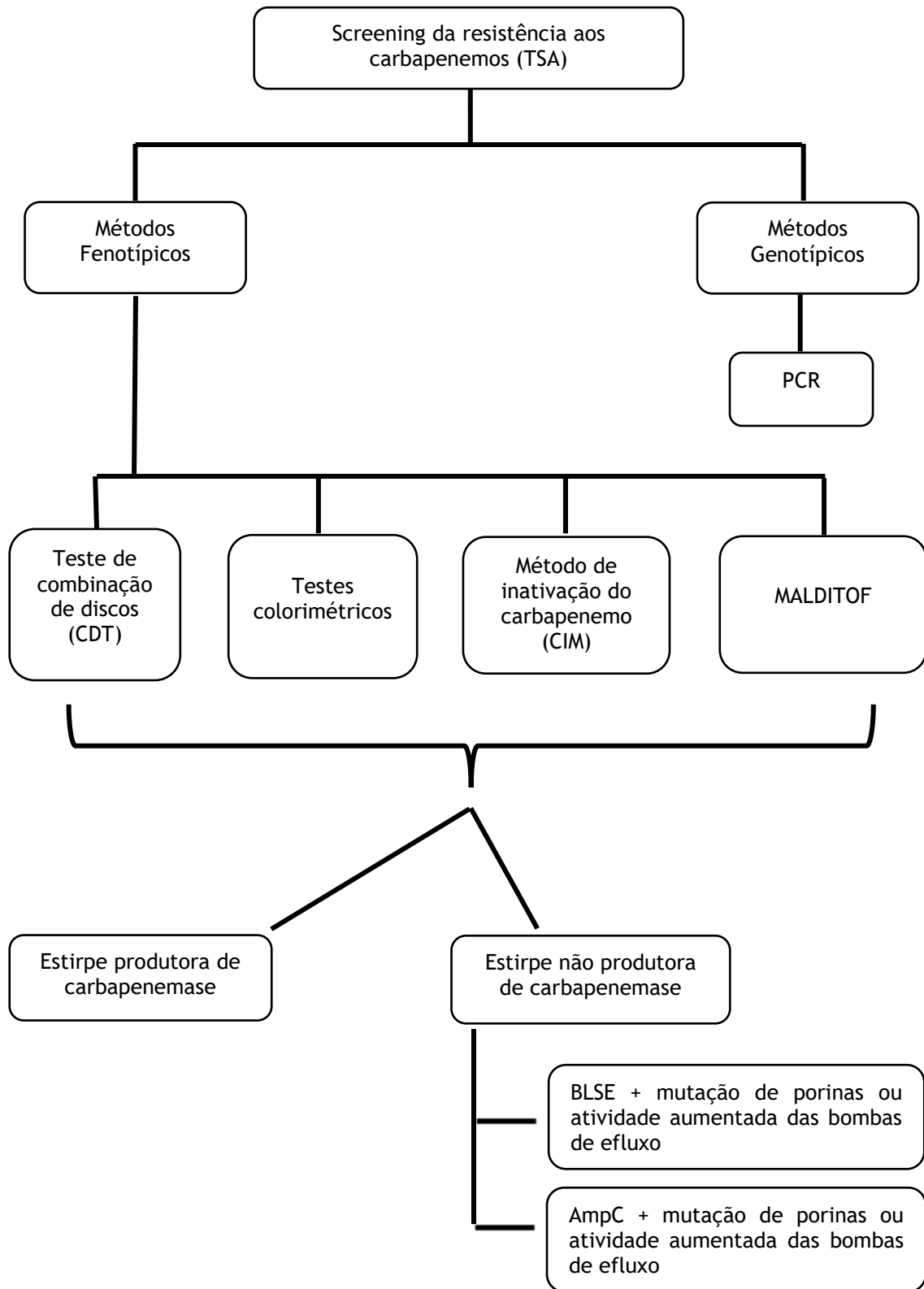


Figura 5 - Métodos utilizados para detetar microrganismos com resistência aos carbapenemos.

## Capítulo 2

### 2. Objetivos

O presente trabalho tem como finalidade identificar a prevalência das estirpes produtoras de carbapenemases na ULS da Guarda e caracterizar o seu perfil fenotípico.

### 3. Métodos

O estudo foi realizado na ULS da Guarda, constituída por dois hospitais, nomeadamente o Hospital Sousa Martins, localizado na Guarda, e o Hospital Nossa Senhora da Assunção, localizado em Seia, por 13 centros de saúde e 1 Unidade de Saúde Familiar. Esta unidade tem como missão a prestação integrada de cuidado de saúde primários, hospitalares, paliativos e de convalescença à população da sua área de influência tendo como objetivo a prestação de cuidados de excelência e participar e desenvolver o ensino e a investigação científica qualificados.

Este trabalho foi executado no Serviço de Patologia Clínica, mais concretamente no laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, e compreende a recolha de dados de janeiro de 2016 até abril de 2019.

Os diversos produtos biológicos, nos quais foram isoladas e identificadas as estirpes que manifestavam resistência ou baixa suscetibilidade aos carbapenemos, foram provenientes dos diferentes serviços e unidades pertencentes à ULS.

#### 3.1 Identificação de isolados bacterianos

As amostras recebidas pelo laboratório foram processadas segundo protocolos específicos, tendo em conta a natureza do produto, que possibilitaram o crescimento do microrganismo patogénico.

Neste estudo foram selecionadas todas as estirpes identificadas e feito o teste de sensibilidade aos antibióticos por um sistema automatizado (VITEK® 2 Compact da Biomerieux®). As estirpes selecionadas manifestavam perfis fenotípicos de resistência ou baixa suscetibilidade aos carbapenemos. Num total de 95 organismos isolados, foram identificadas *K.pneumoniae* (n=91), *E.coli* (n=1), *Enterobacter* (n=2), *Citrobacter freundii* (n= 1).

#### 3.2 Testes de screening

De modo a verificar a suspeita de produção de carbapenemases por parte das bactérias, determinou-se a MIC dos carbapenemos (ertapenemo e meropenemo). Após 24 horas de

incubação foi feita a leitura da elipse que intersepta a escala de gradiente predefinida de concentrações de antibióticos, que foram interpretadas segundo as normas definidas em documento pela EUCAST (Clinical breakpoints for bacteria). Em simultâneo foi efetuado de acordo com as respetivas instruções o teste para a pesquisa de carbapenemases (RAPIDEC® CARBA NP).

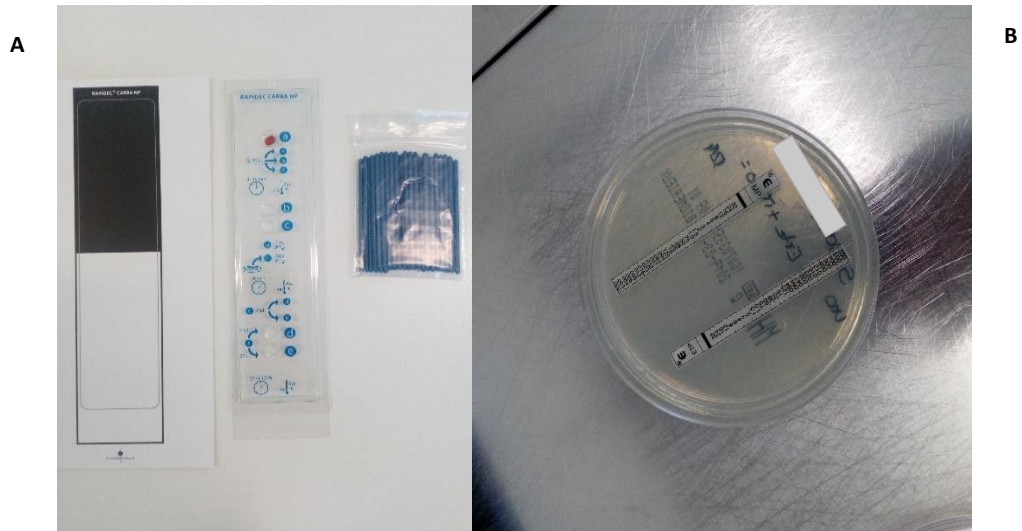


Figura 6 - A- RAPIDEC® CARBA NP; B - E-teste

### 3.3 Testes confirmatórios da presença de carbapenemases

Alguns destes isolados foram caracterizados molecularmente recorrendo ao PCR em tempo real, que pesquisa as sequências de genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{OXA-48}$  e  $bla_{IMP}$  presentes nas estirpes resistentes aos carbapenemos. No total de 91 *K.pneumoniae* foram identificadas KPC (n=31) e OXA-48 (n=2). Relativamente às restantes estirpes, o *Citrobacter freundii* era produtor de VIM e a *E.coli* produtora de KPC.

## 4. Resultados

**Tabela 2** - Número de isolados no Hospital Nossa Senhora da Assunção e no Hospital Sousa Martins, no ano de 2016.

| <b>2016</b>                               | <i>K.pneumoniae</i> com RAPIDEC® CARBA NP positivo + teste molecular (KPC) | <i>K.pneumoniae</i> apenas com RAPIDEC® CARBA NP positivo | <i>Total</i> |
|---|--|---|--------------|
| <i>Hospital Nossa Senhora da Assunção</i> | 4  | 8   | 12           |
| <i>Hospital Sousa Martins</i>             | 1  | -   | 1            |
| <b>Total</b>                              | 5  | 8   | <b>13</b>    |

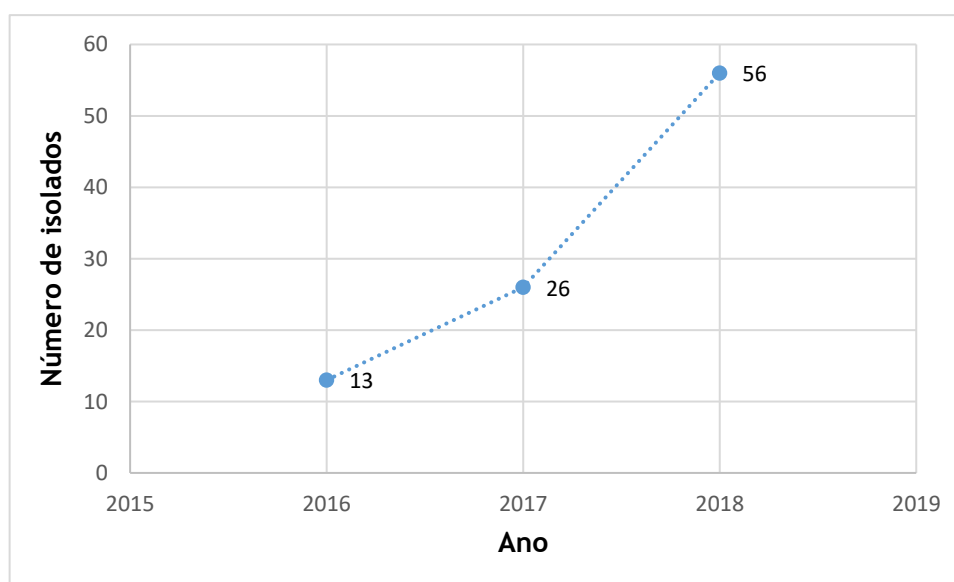
**Tabela 3** - Número de isolados no Hospital Nossa Senhora da Assunção e no Hospital Sousa Martins, em 2017.

| <b>2017</b>                               | <i>K.pneumoniae</i> com RAPIDEC® CARBA NP positivo + teste molecular (KPC) | <i>K.pneumoniae</i> apenas com RAPIDEC® CARBA NP positivo | <i>Enterobacter cloacae</i> complex RAPIDEC® CARBA NP positivo | <i>Total</i> |
|---|--|---|--|--------------|
| <i>Hospital Nossa Senhora da Assunção</i> | 7  | 2   |  | 9            |
| <i>Hospital Sousa Martins</i>             | 10   | 6   | 1  | 17           |
| <b>Total</b>                              | 17   | 8   | 1  | <b>26</b>    |

**Tabela 4** - Número de isolados no Hospital Nossa Senhora da Assunção e no Hospital Sousa Martins, no ano de 2018.

(*E. cloacae* complex - *Enterobacter cloacae* complex; *C. freundii* - *Citrobacter freundii*)

| <b>2018</b>   | <i>K.pneumoniae</i><br>RAPIDEC®<br>CARBA NP<br>positivo + teste<br>molecular (KPC) | <i>K.</i><br><i>pneumoniae</i><br>apenas com<br>RAPIDEC®<br>CARBA NP<br>positivo | <i>E.coli</i><br>com<br>RAPIDEC<br>® CARBA<br>NP<br>positivo<br>+ teste<br>molecula<br>r (KPC) | <i>E.</i><br><i>cloacae</i><br>complex<br>com<br>RAPIDEC<br>® CARBA<br>NP<br>positivo | <i>K.</i><br><i>pneumoniae</i><br>com<br>RAPIDEC®<br>CARBA NP<br>positivo +<br>teste<br>molecular<br>(OXA-48) | <i>C.</i><br><i>freundii</i><br>com<br>RAPIDEC®<br>CARBA NP<br>positivo +<br>teste<br>molecular<br>(VIM) | <i>Total</i> |
|---|--|--|--|---|---|--|--------------|
| <i>Hospital</i><br><i>Nossa</i><br><i>Senhora</i><br><i>da</i><br><i>Assunção</i> | 3  | 17   | 1  |   |   |  | 21           |
| <i>Hospital</i><br><i>Sousa</i><br><i>Martins</i>                                 | 6  | 25   |  | 1   | 2   | 1  | 35           |
| <b>Total</b>  | 9  | 42   | 1  | 1   | 2   | 1  | <b>56</b>    |



**Gráfico 1** - Evolução do número de isolados na ULS com carbapenemases.

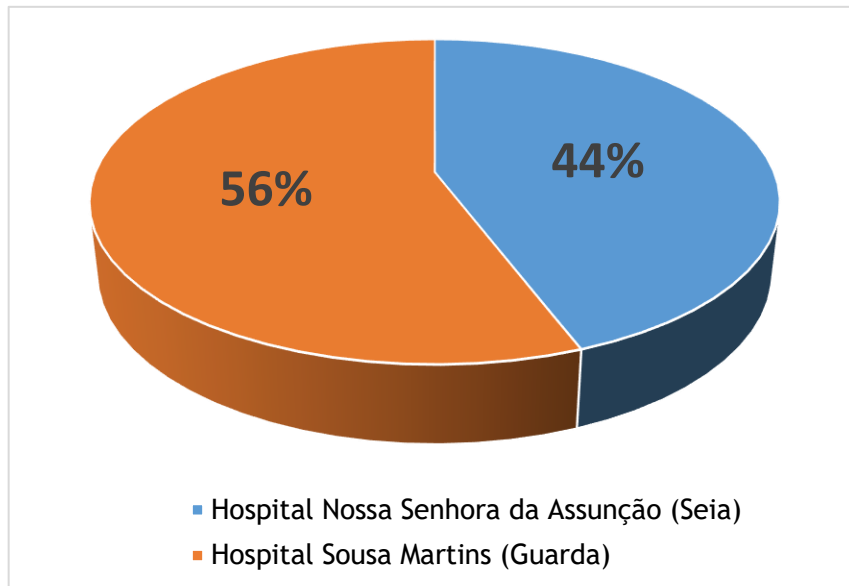


Gráfico 2 - Percentagem de isolados com carbapenemases nos respetivos hospitais.

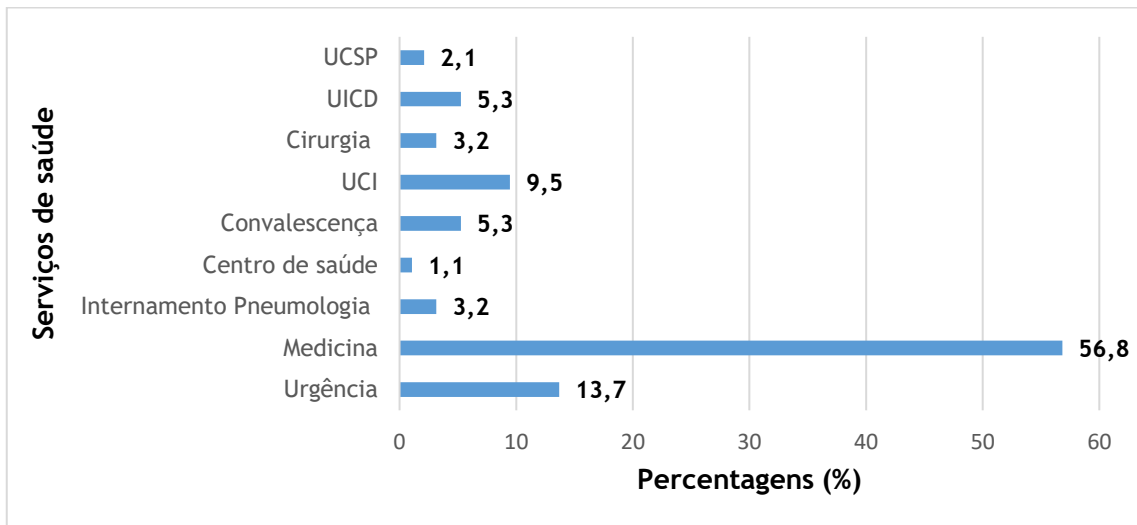


Gráfico 3 - Percentagem de estirpes resistentes aos carbapenemos, isoladas nos diversos serviços de saúde da ULS-Guarda.

(UCSP - Unidades de Cuidados de Saúde Personalizados)

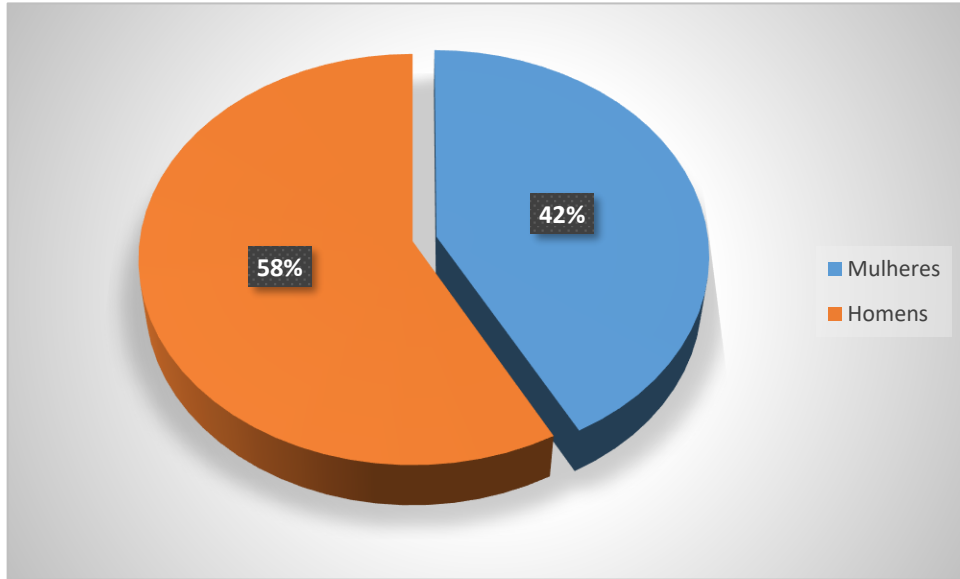


Gráfico 4 - Género (%) dos indivíduos nos quais as bactérias com carbapenemases foram identificadas.

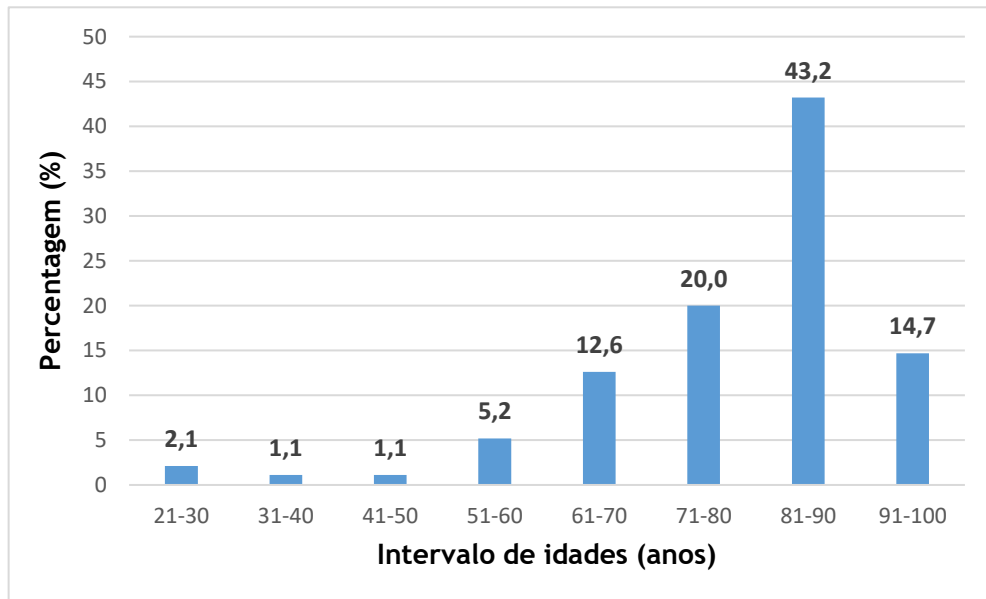


Gráfico 5 - Intervalos de idade (%) nas quais foram isoladas estirpes com carbapenemases.

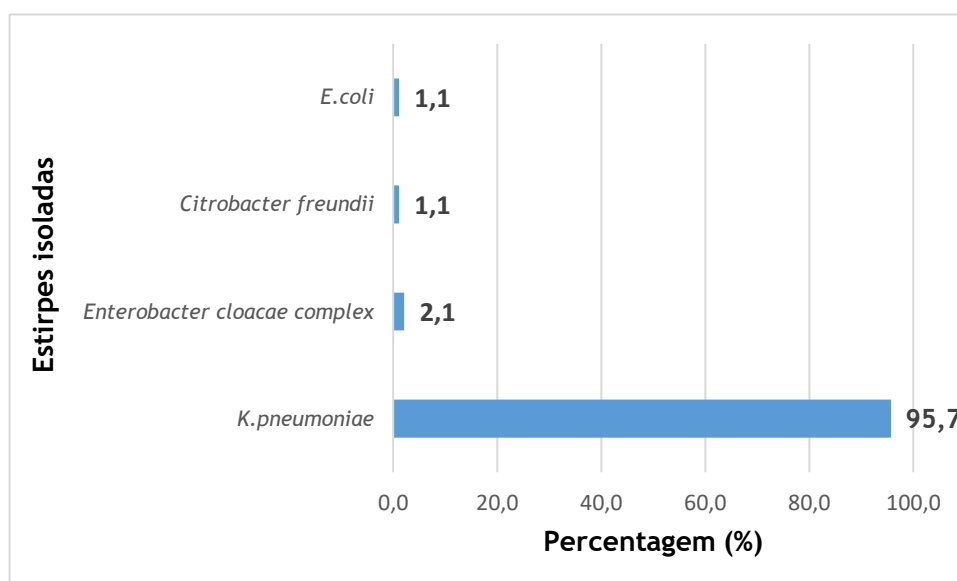


Gráfico 6 - Estirpes produtoras de carbapenemases isoladas na ULS- Guarda, de 2016 a 2018.

Tabela 5 - Produtos biológicos nos quais foram isoladas as estirpes com resistência, no ano de 2016.

| 2016                                | <i>K.pneumoniae</i><br>(KPC) | <i>K.pneumoniae</i><br>RAPIDEC® CARBA NP<br>positivo | Total |
|-------------------------------------|------------------------------|--|-------|
| Urina                               | 1                            | 7  | 8     |
| Hemoculturas                        | -                            | 1  | 1     |
| Expetorações                        | 2                            | -  | 2     |
| Exsudado de ferida<br>não cirúrgica | 1                            | -  | 1     |
| Aspirado brônquico                  | 1                            | -  | 1     |

Tabela 6 - Produtos biológicos nos quais foram isoladas as estirpes com resistência, em 2017.

| <b>2017</b>                   | <i>K.pneumoniae</i><br>(KPC) | <i>K.pneumoniae</i><br>RAPIDEC® CARBA<br>NP positivo | <i>Enterobacter</i><br><i>cloacae</i><br>complex RAPIDEC®<br>CARBA NP positivo | <b>Total</b> |
|-------------------------------|------------------------------|--|--|--------------|
| <i>Urina</i>                  | 10                           | 4  | 1  | 15           |
| <i>Hemoculturas</i>           | 2                            | 1  | -  | 3            |
| <i>Expetorações</i>           | 4                            | 1  | -  | 5            |
| <i>Aspirado<br/>brônquico</i> | -                            | 2  | -  | 2            |
| <i>Biópsia</i>                | 1                            | -  | -  | 1            |

Tabela 7 - Produtos biológicos nos quais foram isoladas as estirpes com resistência, no ano 2018.

| <b>2018</b>                                  | <i>K. pneumoniae</i><br>(KPC) | <i>K. pneumoniae</i><br>RAPIDEC® CARBA NP | <i>E. coli</i><br>(KPC) | <i>E. cloacae</i><br>complex RAPIDEC®<br>CARBA NP positivo | <i>K. pneumoniae</i><br>(OXA-48) | <i>C. freundii</i><br>(VIM) | <b>Total</b> |
|--|-------------------------------|---|-------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------|--------------|
| <i>Urina</i>                                 | 7                             | 28  | 1                       | 1  | 2                                |                             | 39           |
| <i>Hemoculturas</i>                          |                               | 3   |                         |  |                                  |                             | 3            |
| <i>Pus</i>                                   | 1                             | 1   |                         |  |                                  |                             | 2            |
| <i>Aspirados</i>                             |                               | 1   |                         |  |                                  |                             | 1            |
| <i>Expetorações</i>                          | 1                             | 7   |                         |  |                                  |                             | 8            |
| <i>Secreções</i>                             |                               | 1   |                         |  |                                  |                             | 1            |
| <i>Exsudado<br/>ferida não<br/>cirúrgica</i> |                               | 1   |                         |  |                                  | 1                           | 2            |

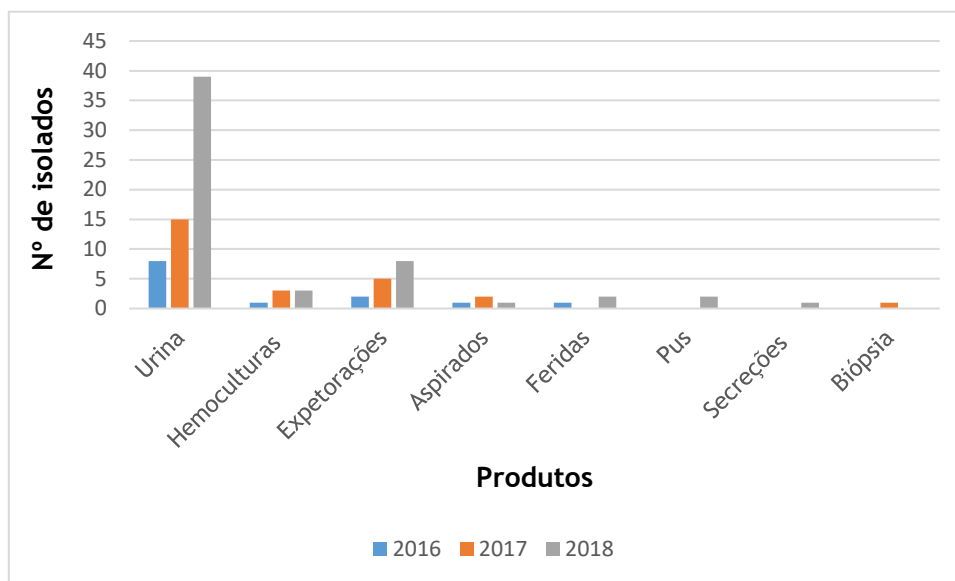


Gráfico 7 - Número de isolados nos diferentes produtos, desde 2016 a 2018.

**Tabela 8** - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo, no ano 2016.

| <b>2016</b>                        |   | <i>K.pneumoniae</i><br>(KPC) | <i>K.pneumoniae</i><br>RAPIDEC® CARBA NP | Percentagem de<br>resistência/<br>resistência<br>intermédia (%) |
|------------------------------------|---|------------------------------|--|---|
| <i>Ampicilina</i>                  | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 7  |   |
| <i>Amoxicilina/Ác. Clavulânico</i> | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 7  |   |
| <i>Piperacilina/Tazobactam</i>     | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 7  |   |
| <i>Cefuroxima</i>                  | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 7  |   |
| <i>Cefuroxima Axetil</i>           | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 7  |   |
| <i>Cefotaxima</i>                  | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 7  |   |
| <i>Ceftazidima</i>                 | S |                              |  | 100   |
|                                    | R | 5                            | 8  |   |
|                                    | S |                              |  |   |

Perfil fenotípico das estirpes de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos na ULS-Guarda

|                       |   |   |   |           |
|-----------------------|---|---|---|-----------|
| <i>Cefepima</i>       | I | 1 | 6 | 12,5/87,5 |
|                       | R |   | 1 |           |
| <i>Ertapenem</i>      | S |   |   | 100       |
|                       | R | 5 | 7 |           |
| <i>Meropenem</i>      | S |   |   | 100       |
|                       | R | 4 | 2 |           |
| <i>Imipenem</i>       | S |   |   | 87,5/12,5 |
|                       | I |   | 1 |           |
|                       | R | 1 | 6 |           |
| <i>Amicacina</i>      | S |   |   | 0/100     |
|                       | I | 4 | 2 |           |
|                       | R |   |   |           |
| <i>Gentamicina</i>    | S |   |   | 100       |
|                       | R | 5 | 8 |           |
| <i>Ciprofloxacina</i> | S |   |   | 100       |
|                       | R | 5 | 8 |           |
| <i>Fosfomicina</i>    | S |   | 1 | 85,7      |
|                       | R | 1 | 5 |           |

Perfil fenotípico das estirpes de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos na ULS-Guarda

|  |   |   |   |             |
|--|---|---|---|-------------|
| <b><i>Colistina</i></b>                  | S | 4 | 7 | <b>15,4</b> |
|  | R | 1 | 1 |             |
| <b><i>Trimetoprim/Sulfametoxazol</i></b> | S |   |   | <b>100</b>  |
|  | R | 5 | 8 |             |

**Nota:** A sensibilidade ou resistência dos antibióticos nesta e nas seguintes tabelas foi considerada segundo os valores da MIC, estabelecidos pela EUCAST.

**Tabela 9** - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo, em 2017.

| 2017                               | <i>K.pneumoniae</i><br>(KPC) |    | <i>K.pneumoniae</i><br>RAPIDEC® CARBA NP |   | <i>Enterobacter cloacae</i> complex<br>RAPIDEC® CARBA NP |   | Percentagem de resistência/<br>resistência intermédia (%) |
|------------------------------------|------------------------------|----|--|---|--|---|---|
|                                    | S                            | R  | S  | R | S  | R |   |
| <i>Ampicilina</i>                  | S                            |    |  |   |  |   | 100   |
|                                    | R                            | 17 | 8  | 1 |  |   |   |
| <i>Amoxicilina/Ác. Clavulânico</i> | S                            |    |  |   |  |   | 100   |
|                                    | R                            | 17 | 8  | 1 |  |   |   |
| <i>Piperacilina/Tazobactam</i>     | S                            |    |  |   |  |   | 100   |
|                                    | R                            | 15 | 7  |   |  |   |   |
| <i>Cefuroxima</i>                  | S                            |    |  |   |  |   | 100   |
|                                    | R                            | 17 | 8  |   |  |   |   |
| <i>Cefuroxima Axetil</i>           | S                            |    |  |   |  |   | 100   |
|                                    | R                            | 17 | 8  | 1 |  |   |   |
| <i>Cefotaxima</i>                  | S                            |    |  |   |  |   | 96,2/3,8  |
|                                    | I                            | 1  |  |   |  |   |   |
|                                    | R                            | 16 | 8  | 1 |  |   |   |
| <i>Ceftazidima</i>                 | S                            |    |  |   |  |   | 100   |
|                                    | R                            | 17 | 8  | 1 |  |   |   |
| <i>Cefepima</i>                    | S                            | 1  |  |   |  |   | 38,5/57,7   |
|                                    | I                            | 11 | 3  | 1 |  |   |   |
|                                    | R                            | 5  | 5  |   |  |   |   |

Perfil fenotípico das estirpes de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos na ULS-Guarda

|                                   |   |    |   |   |           |
|-----------------------------------|---|----|---|---|-----------|
| <i>Ertapenem</i>                  | S |    |   |   | 88,5/11,5 |
|                                   | I | 2  | 1 |   |           |
|                                   | R | 15 | 7 | 1 |           |
| <i>Meropenem</i>                  | S | 4  | 3 | 1 | 56,5/8,7  |
|                                   | I |    | 2 |   |           |
|                                   | R | 11 | 2 |   |           |
| <i>Imipenem</i>                   | S |    |   | 1 | 0/75      |
|                                   | I | 2  | 1 |   |           |
|                                   | R |    |   |   |           |
| <i>Amicacina</i>                  | S | 1  |   |   | 18,2/81,0 |
|                                   | I | 12 | 5 |   |           |
|                                   | R | 2  | 2 |   |           |
| <i>Gentamicina</i>                | S | 2  | 2 |   | 84,6      |
|                                   | R | 15 | 6 | 1 |           |
| <i>Ciprofloxacina</i>             | S | 2  | 2 |   | 84,6      |
|                                   | R | 15 | 6 | 1 |           |
| <i>Fosfomicina</i>                | S | 13 | 4 | 1 | 30,8      |
|                                   | R | 4  | 4 |   |           |
| <i>Colistina</i>                  | S | 15 | 8 | 1 | 7,7       |
|                                   | R | 2  |   |   |           |
| <i>Trimetoprim/Sulfametoxazol</i> | S |    |   |   | 100       |
|                                   | R | 17 | 8 | 1 |           |

Tabela 10 - Suscetibilidade aos antibióticos das estirpes em estudo, no ano de 2018.

| 2018                               |   | <i>K.pneumoniae</i><br>(KPC) | <i>E.coli</i><br>(KPC) | <i>K.pneumoniae</i><br>RAPIDEC® CARBA NP | <i>K.pneumoniae</i><br>(OXA-48) | <i>Citrobacter</i><br><i>freundii</i><br>(VIM) | <i>Enterobacter</i><br><i>cloacae</i><br>complex<br>RAPIDEC®<br>CARBA NP | Percentagem de<br>resistência/<br>resistência<br>intermédia (%) |
|------------------------------------|---|------------------------------|------------------------|--|---------------------------------|--|--|---|
| <i>Ampicilina</i>                  | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 100   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 42                                       | 2                               | 1  | 1  |   |
| <i>Amoxicilina/Ác. Clavulânico</i> | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 100   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 42                                       | 2                               | 1  | 1  |   |
| <i>Piperacilina/Tazobactam</i>     | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 100   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 42                                       | 2                               | 1  | 1  |   |
| <i>Cefuroxima</i>                  | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 100   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 42                                       | 2                               |  | 1  |   |
| <i>Cefuroxima Axetil</i>           | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 100   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 42                                       | 2                               | 1  | 1  |   |
| <i>Cefotaxima</i>                  | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 98,2/1,8  |
|                                    | I |                              |                        | 1  |                                 |  |  |   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 41                                       | 2                               | 1  | 1  |   |
| <i>Ceftazidima</i>                 | S |                              |                        |  |                                 |  |  | 100   |
|                                    | R | 9                            | 1                      | 42                                       | 2                               | 1  | 1  |   |
| <i>Cefepima</i>                    | S |                              |                        | 1  |                                 |  |  | 33,9/64,3   |
|                                    | I | 4                            | 1                      | 29                                       | 1                               |  | 1  |   |
|                                    | R | 5                            |                        | 12                                       | 1                               | 1  |  |   |
| <i>Ertapenem</i>                   | S |                              | 1                      | 4  |                                 | 1  |  | 78,6/10,7   |
|                                    | I | 2                            |                        | 4  |                                 |  |  |   |
|                                    | R | 7                            |                        | 34                                       | 2                               |  | 1  |   |

Perfil fenotípico das estirpes de *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenemos na ULS-Guarda

|                                   |   |   |   |    |   |   |   |           |
|-----------------------------------|---|---|---|----|---|---|---|-----------|
| <i>Meropenem</i>                  | S | 3 | 1 | 13 | 2 | 1 |   | 46,4/17,9 |
|                                   | I | 2 |   | 7  |   |   | 1 |           |
|                                   | R | 4 |   | 22 |   |   |   |           |
| <i>Amicacina</i>                  | S | 4 | 1 | 7  | 2 | 1 |   | 12,5/60,7 |
|                                   | I | 4 |   | 29 |   |   | 1 |           |
|                                   | R | 1 |   | 6  |   |   |   |           |
| <i>Gentamicina</i>                | S |   | 1 | 3  | 1 |   |   | 91,1      |
|                                   | R | 9 |   | 39 | 1 | 1 | 1 |           |
| <i>Ciprofloxacina</i>             | S | 2 |   | 23 |   |   |   | 50,0/5,4  |
|                                   | I | 2 |   | 1  |   |   |   |           |
|                                   | R | 5 | 1 | 18 | 2 | 1 | 1 |           |
| <i>Fosfomicina</i>                | S | 8 | 1 | 36 | 1 | 1 | 1 | 14,3      |
|                                   | R | 1 |   | 6  | 1 |   |   |           |
| <i>Colistina</i>                  | S | 9 | 1 | 41 | 2 | 1 | 1 | 1,8       |
|                                   | R |   |   | 1  |   |   |   |           |
| <i>Trimetoprim/Sulfametoxazol</i> | S |   |   | 5  |   | 1 |   | 89,3      |
|                                   | R | 9 | 1 | 37 | 2 |   | 1 |           |

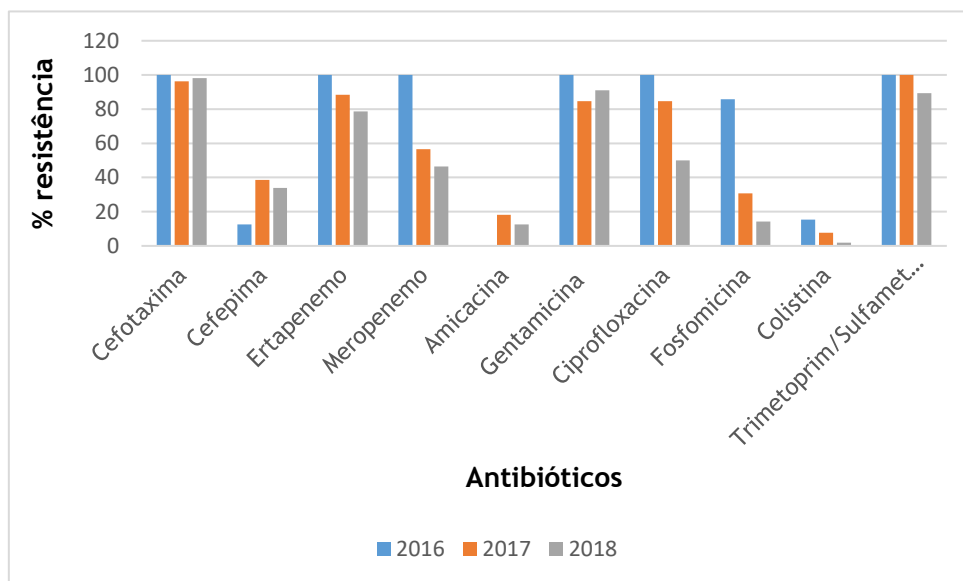


Gráfico 8 - Evolução da percentagem de resistência aos variados antibióticos, 2016-2018.

## 5. Discussão

A rápida emergência das resistências aos carbapenemos representa um grande problema atual, visto que, reduz a disponibilidade de terapêuticas alternativas, aumenta a taxa de mortalidade e consequentemente aumenta os custos do sistema de saúde (Sahuquillo-Arce J. *et al.*, 2015).

Uma ampla diversidade de bactérias resistentes aos carbapenemos tem surgido, sendo a família das *Enterobacteriales* a que apresenta maior impacto epidemiológico, principalmente *K.pneumoniae*, *E.coli* e *Enterobacter*. Estas estirpes exibem vários mecanismos de resistência e de modo a evitar as consequências avassaladoras das CPE é fundamental a sua deteção, pois permite atuar rapidamente, implementando medidas de isolamento e permite decidir o melhor tratamento.

No presente estudo verificou-se que o número de estirpes produtoras de carbapenemases tem sofrido um crescimento significativo ao longo dos anos, tal como se pode visualizar no gráfico 1. De 2017 para 2018, o número de estirpes com carbapenemases isoladas aumentou mais do dobro contribuindo para uma maior preocupação. Esta disseminação deve-se à capacidade inata de adaptação das bactérias e à facilidade de transmissão entre estirpes, como por exemplo a prevalência da KPC em plasmídeos transmissíveis a outras estirpes (Chuquisapon M., 2018). Por outro lado, atualmente, devido à rápida emergência de bactérias resistentes, a Direção Geral de Saúde (DGS) ao abrigo da Norma 004/2013 atualizada em 13/11/2015, obriga os laboratórios de patologia clínica do sistema de saúde a fazer a notificação imediata dos microrganismos considerados “alerta” e a notificação mediata dos microrganismos “problema”, dinamizando o sistema de vigilância epidemiológica de resistência aos antimicrobianos. Os microrganismos “alerta” são pouco prevalentes em Portugal e demonstram resistências ou suscetibilidade intermédia a determinado tipo de antimicrobianos e exigem a implementação de medidas de controlo. Os microrganismos considerados “alerta” são o *Staphylococcus aureus* com resistência à vancomicina (VRSA), *Staphylococcus aureus* com resistência ao linezolid, *Staphylococcus aureus* resistente à daptomicina, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* com resistência ao linezolid, *Enterobacteriales* com suscetibilidade intermédia ou resistência aos carbapenemos e/ou presumíveis produtoras de carbapenemases, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* resistentes à colistina. As bactérias alvo deste nosso estudo estão incluídas nas *Enterobacteriales* “alerta”. Devido à necessidade de notificar estas estirpes, os laboratórios são obrigados a procurá-las na rotina diária, o que favorece a sua crescente descoberta (DGS, 2015). No estudo realizado na ULS-Guarda e observando o gráfico 6, isolou-se um maior número de *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos representando a quase totalidade de estirpes (95,8%). Fazendo o paralelismo com um estudo realizado pela DGS, entre o ano 2014 e 2017, também este demonstrou um aumento considerável no que diz respeito a *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos (European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Stockholm: ECDC; 2018).

No nosso estudo foram isoladas 95 *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases. Destas, 44% foram isoladas de produtos biológicos provenientes de doentes do Hospital de Seia, sendo as restantes 56% provenientes do Hospital da Guarda. Constatou-se ainda que, em 2016, existiam mais casos de resistências aos carbapenemos em Seia, mas esta realidade mudou rapidamente a partir de 2017 pois foi maior o número de estirpes de CPE isoladas na unidade da Guarda, provavelmente porque a presença destas estirpes está a grande maioria das vezes associada a situações clínicas mais complicadas que são sempre transferidas para a unidade hospitalar da Guarda.

No que se refere ao género dos indivíduos portadores de bactérias com carbapenemases e tendo como fundamento o gráfico 4, o sexo mais afetado é o masculino representando 58% do total de isolados. Este resultado coincide com um estudo realizado por Mariappan e seus colaboradores, pois no total de 111 doentes, 66,7% eram homens (Mariappan S. *et al.*, 2017).

No que diz respeito às idades dos doentes portadores de bactérias resistentes aos carbapenemos e tendo como suporte o gráfico 5, constatou-se que o intervalo de idades com maior percentagem deste tipo de isolados é o 81-90 anos, com 43,2%. Nestas idades o sistema imunitário encontra-se mais frágil, não têm tanta capacidade de reação contra agentes causadores de infeções e por consequência são mais suscetíveis.

É também no serviço de medicina que habitualmente são internados os doentes mais idosos o que explicará em parte a maior prevalência deste tipo de estirpes facilmente observado no gráfico 3 (com uma percentagem de 56,8%). É necessário consciencializar os profissionais de saúde e a população para a importância da higienização das mãos e de outras regras básicas de precaução de infeções, com o objetivo de minimizar o seu risco (Organização Mundial da Saúde, 2009).

Face aos resultados obtidos e considerando o gráfico 6 verificou-se que 95,7% dos organismos isolados correspondem a *K.pneumoniae*, 2,1% *Enterobacter cloacae complex*, 1,1% a *E.coli* e 1,1% *Citrobacter freundii*. Estes dados são concordantes com o estudo elaborado por Singh-Moodley e seus colaboradores pois num total de 2678 isolados, 52,8% foram *K.pneumoniae* seguido de 6,3% *Enterobacter cloacae*. Do total de estirpes isoladas, apenas 35 foram caracterizadas molecularmente, em que 32 são KPC, 2 OXA-48 e 1 VIM. Nas restantes 60 estirpes apenas se efetuou o teste RAPIDEC® CARBA NP com resultado positivo, visto que os testes moleculares são muito dispendiosos e por isso eram realizados unicamente em situações que requeriam algum cuidado. O aumento exponencial do aparecimento de bactérias resistentes conduziu à necessidade de as caracterizar molecularmente de forma a obter um conhecimento epidemiológico, contribuindo para a adoção de boas práticas e para um melhor controlo da infeção.

Relativamente aos produtos biológicos nos quais foram isolados os microrganismos e tendo como suporte o gráfico 7, observou-se que a maioria foram detetados na urina (65,3%), seguida das expetorações (15,8%) e das hemoculturas (7,4%). Num estudo executado por Senchyna e seus

colaboradores, também a urina foi o produto biológico com mais microrganismos produtores de carbapenemases isolados, representando 39,3% (Senchyna F. *et al.*, 2019).

Como grande parte destas estirpes normalmente têm múltiplas resistências existe uma enorme dificuldade em encontrar tratamento para as infeções provocadas por organismos Gram negativos resistentes, sendo necessário desenvolver novos antimicrobianos capazes de prevenir e tratar estas infeções. Enquanto se aguarda por opções de tratamento mais eficazes, são utilizados antibióticos já produzidos e os quais não apresentam resistências, tendo como objetivo reduzir o impacto.

Através da análise do gráfico 8, verifica-se que inicialmente estas estirpes apresentavam um fenótipo de resistências não só aos  $\beta$ -lactâmicos como à maioria dos outros grupos de antibióticos (aminoglicosídeos, quinolonas, antimetabolitos) tendo vindo a diminuir, o que pode resultar da crescente consciencialização por parte dos médicos na salvaguarda dos antibióticos de última linha.

Considerando os carbapenemos estudados, ertapenemo e meropenemo, e atendendo ao gráfico 8, verifica-se que a percentagem de resistência ao ertapenemo é maior do que a do meropenemo. Estes resultados devem-se ao facto deste último ter um espectro de ação mais alargado e se reservar para infeções provocadas por *P.aeruginosa*, o que contribui para que seja menos prescrito (Nordmann P. *et al.*, 2012).

Para estirpes multirresistentes ou resistentes a todas ou quase todas as classes de antibióticos, as opções atualmente disponíveis consistem na combinação de carbapenemos com outros antibióticos, nomeadamente com polimixinas (colistina), fosfomicina, glicilciclina (tigeciclina) e aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), uma vez que pode melhorar notavelmente as infeções provocadas por estas estirpes (Zhang W. *et al.*, 2018).

No nosso estabelecimento, a percentagem de resistência à amicacina diminuiu de 2017 para 2018 havendo 18,2% de resistência em 2017 e diminuindo em 2018 para 12,5%. No caso da gentamicina, em 2016, todas as estirpes isoladas manifestavam resistência a este aminoglicosídeo e no ano seguinte a resistência baixou para 84,6%, aumentando novamente em 2018 para 91,1%. Relativamente à fosfomicina e à ciprofloxacina, as percentagens de resistência decresceram consideravelmente de 2016 para 2018, passando de 85,7% para 14,3% e de 100% para 50%, respetivamente. No que diz respeito à cefepima, no ano 2016, a sua resistência registada foi de 12,5%, aumentando em 2017 para 38,5% e diminuindo ligeiramente em 2018 para 33,9%. Em relação à cefotaxima, cefalosporina de 3ª geração, em 2016 apresentava 100% de resistência, a qual reduziu para 96,2% no ano seguinte e em 2018 voltou a subir para 98,2%. O Trimetoprim/Sulfametoxazol foi outro exemplo de antibiótico cuja percentagem de resistência diminuiu do ano 2017 (100%) para 2018 (89,3%).

Segundo a Rede Europeia de Vigilância do Consumo de Antimicrobianos (ESAC-Net), o consumo de polimixinas, particularmente da colistina, quase duplicou de 2009 para 2013, na Europa.

Como consequência deste consumo, principalmente quando o perfil de resistência *in vitro* revela a colistina como única opção para *Enterobacteriales*, também a resistência a este antibiótico aumentou, desencadeando aqui novamente maior preocupação (Albiger B. *et al.*, 2015). Esta preocupação surge do facto da colistina ser o último recurso usado no combate a este tipo de estirpes (Dandachi I. *et al.*, 2018). Na nossa instituição, em 2016, num total de 13 estirpes CPE isoladas, 2 manifestavam resistência à colistina e no ano seguinte de 26 estirpes continuou a haver 2 estirpes resistentes a este antibiótico. No ano 2018, em 56 isolados, apenas um apresentava resistência a esta polimixina. De acordo com estes resultados é possível constatar que na nossa instituição o isolamento de microrganismos com resistência à colistina tem vindo a diminuir, provavelmente resulta do facto deste antibiótico apenas ser utilizado como recurso em situações de estirpes com resistências a todas as outras classes de antibióticos sempre que haja outras alternativas.

De acordo com os dados do ECDC, a incidência de infeções provocadas por *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos cresceu substancialmente, o que dificultou o seu tratamento. Dado que a epidemiologia de *K.pneumoniae* produtoras de KPC é a mais significativa, houve a necessidade de desenvolver uma terapêutica eficaz contra as infeções provocadas pelas mesmas. A combinação da ceftazidima, uma cefalosporina de 3<sup>a</sup> geração, com avibactam, inibidor de B-lactamases, tem demonstrado grande eficácia quer para KPC quer para OXA-232 (Zhang W. *et al.*, 2018). Esta combinação juntamente com aztreonam revela ser uma opção promissora contra estirpes de *Enterobacteriales* produtoras de MBLs ou *P.aeruginosa* resistentes aos carbapenemos (Peri A. *et al.*, 2019). Outras terapêuticas têm sido desenvolvidas, tais como, o meropenemo-vaborbactam e o imipenemo-relebactam, no entanto, as estirpes produtoras de OXA-48 e de outras MBLs ainda não apresentam suscetibilidade a estas combinações, sendo necessário continuar a investigação de alternativas (Senchyna F. *et al.*, 2018).

No futuro é necessário promover ações de formação de boas práticas de prevenção e controlo de infeções de modo a diminuir a transmissão de infeções, com o objetivo de reduzir a antibioterapia e consequentemente as resistências associadas. É fundamental sensibilizar as pessoas de modo a usarem os antibióticos apenas quando necessário (diminuindo a automedicação), evitar a sua eliminação para o ambiente e limitar a sua utilização na pecuária (Sousa J., 2005).

## Referências Bibliográficas

1. Albiger B., Glasner C., Struelens M.J., Grundmann H. and Monnet D.L.; European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group, 2015. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015*. Euro Surveill. 20(45):1-18.
2. Albin O.R., Patel T.S. and Kaye K.S., 2018. *Meropenem-vaborbactam for adults with complicated urinary tract and other invasive infections*. Expert Rev Anti Infect Ther. 16(12):865-876.
3. Ang H. and Sun X., 2018. *Risk factors for multidrug-resistant Gram-negative bacteria infection in intensive care units: A meta-analysis*. Int J Nurs Pract. 24(4):e12644
4. Baeza L.L., Pfennigwerth N., Greissl C., Göttig S., Saleh A., Stelzer Y., Gattermann S.G. and Hamprecht A., 2019. *Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacteriales with proposal of a new algorithm*. Clin Microbiol Infect. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.003.
5. Bonomo R.A., Burd E.M., Conly J., Limbago B.M., Poirel L., Segre J.A. and Westblade L.F., 2018. *Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge*. Clin Infect Dis. 66(8):1290-1297.
6. Bush K., 2018. *Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases*. Antimicrob Agents Chemother. 64(10): 1-20.
7. Calisto F. A. G., 2011. *Emergência de Carbapenemases em Klebsiellapneumoniae: O desafio de bactérias multirresistentes e virulentas*. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa, Portugal.
8. Chuquisapon M., 2018. *Detección fenotípica de carbapenemasas en Acinetobacter spp. De un hospital de Lima 2016*. Tese de Licenciatura. Universidade Nacional Federico Villarreal, Perú.
9. Codjoe F.S. and Donkor E.S., 2017. *Carbapenem Resistance: A Review*. MedSci (Basel). 6(1): 1-28.
10. Coutinho T., 2018. *Bactérias produtoras de carbapenemases num Serviço de Cuidados Intensivos (SCI)*. Tese de mestrado. Universidade do Porto, Portugal.
11. Dandachi I., Chabou S., Daoud Z. and Rolain J.M., 2018. *Prevalence and Emergence of Extended-Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram Negative Bacteria of Animal Origin in the Mediterranean Basin*. Front Microbiol. 9:2299. doi: 10.3389/fmicb.2018.02299.
12. Davoudi-Monfared E. and Khalili H., 2018. *The threat of carbapenem-resistant gram-negative bacteria in a Middle East region*. Infect Drug Resist. 11:1831-1880.
13. Direção Geral de Saúde. Norma nº 004/2013 de 08/08/2013, atualizada a 13/11/2015: Vigilância Epidemiológica das Resistências aos Antimicrobianos.

14. Dortet L., Poirel L. and Nordmann P., 2012 *Rapid Identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test*. Antimicrob Agents Chemother. 56(12):6437-6440.
15. El Salabi A, Toleman M, Weeks J., Bruderer T., Frei R. and Walsh T., 2009. *First Report of the Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 in Europe*. Antimicrob Agents Chemother. 54(1): 582
16. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (<http://mic.eucast.org/>, acedido dia 10 de janeiro 2019)
17. *European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC; 2014.
18. *European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017*. Stockholm: ECDC; 2018.
19. Girlich D., Poirel L. and Nordmann P., 2012. *Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 50(2):477-479.
20. Giske C., Martinez-Martinez L., Cantón R., Stefani S., Skov R., Glupczynski Y., Nordmann P., Wootton M., Miriagou V., Simonsen G., Zemlickova H., Cohen-Stuart J. and Gniadkowski M., 2017. *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*. EUCAST. 2:1-43.
21. Ghebremedhin, B., Halstenbach A., Smiljanic M., Kaase M. and Ahmad-Nejad P., 2016. *MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 15: 5.
22. Huang T.D., Berhin C., Bogaerts P. and Glupczynski Y., 2014. *Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 79(2):252-254.
23. Ibrahim Y., Sani Y., Saleh Q., Saleh A. and Hakeem G., 2017. *Phenotypic Detection of Extended Spectrum Beta lactamase and Carbapenemase Co-producing Clinical Isolates from Two Tertiary Hospitals in Kano, North West Nigeria*. Ethiop J Health Sci. 27(1):3-10.
24. Jiao Y., Qin Y., Liu J., Li Q., Dong Y., Shang Y., Huang Y. and Liu R., 2015. *Risk factors for carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study*. PathogGlobHealth. 109(2):68-74.
25. Lasserre C., De Saint Martin L., Cuzon G., Bogaerts P., Lamar E., Glupczynski Y., Naas T. and Tandé D., 2015. *Efficient Detection of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes*. J. Clin. Microbiol. 53(7):2163-2171.

26. Lavagnoli S.L., Bassetti B.R., Kaiser T.D.L., Kutz K.M. and Cerutti C. Jr., 2017. *Factors associated with acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae*. Rev. Latino-Am. Enfermagem.25:e2935.
27. Lee K., Yum J., Yong D., Lee H., Kim H., Docquier J., Rossolini G. and Chong Y., 2005. *Novel Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaSIM-1, in a Class 1 Integron from Acinetobacter baumannii Clinical Isolates from Korea*. Antimicrob Agents Chemother. 49(11): 4485-4491.
28. Leitão I.L.M., 2014. *Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases: um novo desafio no controlo da infecção hospitalar*. Dissertação de mestrado. Universidade de Lisboa, Portugal.
29. Letourneau A.R., 2017. *Beta-lactam antibiotics: mechanisms of action and resistance and adverse effects*. UptoDate
30. Ling M., Tee Y., Tan S., Amin I., How K., Tan K. and Lee L., 2015. *Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore*. Antimicrob Resist Infect Control. 4: 26.
31. Logan L.K. and Weinstein R. A., 2017. *The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace*. J Infect Dis.215(suppl\_1):S28-S36
32. Mariappan S., Sekar U. and Kamalanathan A., 2017. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes*. Int J Appl Basic Med Res. 7(1): 32-39.
33. Meier M. and Hamprecht A., 2018. *Rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures by the  $\beta$ -CARBA test*. Eur. J. Clin.Microbiol. Infect. Dis. doi: 10.1007/s10096-018-3422-4.
34. Meletis G., 2016. *Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives*. TherAdv Infect Dis. 3(1):15-21.
35. Noël A., Huang T., Berhin C., Hoebeke M., Bouchahrouf W., Yunus S., Bogaerts P. and Glupczynski Y., 2017. *Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria*. J Clin Microbiol. 55(2): 510-518.
36. Nordmann P., Gniadkowski M., Giske C.G., Poirel L., Woodford N. and Miriagou V., 2012. *Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 18(5):432-438.
37. Organização Mundial da Saúde, 2009. WHO guidelines on hand hygiene in health care. Geneva: OMS.
38. Papagiannitsis C., Študentová V., Izdebski R., Oikonomou O., Pfeifer Y., Petinaki E. and Hrabák J. 2015. *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenemhydrolysis assay with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity*. J. Clin. Microbiol. 53(5):1731-1735.

39. Pasteran F., Denorme L., Ote I., Gomez S., De Belder D., Glupczynski Y., Bogaerts P., Ghiglione B., Power P., Mertens P. and Corso A., 2016. *Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay*. J Clin Microbiol. 54(11):2832-2836
40. Pasteran F., Veliz O., Ceriana P., Lucero C., Rapoport M., Albornoz E., Gomez S. and Corso A., 2015. *Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli*. J Clin Microbiol. 53(6):1996-1998.
41. Peri A.M., Doi Y., Potoski B.A., Harris P.N.A., Paterson D.L. and Righi E., 2019. *Antimicrobial treatment challenges in the era of carbapenem resistance*. Diagn Microbiol Infect Dis. S0732-8893(19)30109-9.
42. Perovic O., Britz E., Chetty V. and Singh-Moodley A., 2016. *Molecular detection of carbapenemase-producing genes in referral Enterobacteriaceae in South Africa: A short report*. S Afr Med J. 106(10):975-977.
43. Porreca A.M., Sullivan K.V. and Gallagher J.C., 2018. *The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms*. Curr Infect Dis Rep. 20(6):13
44. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA), Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Vigilância Epidemiológica das Infeções Associadas aos Cuidados de Saúde, *Prevenção da transmissão de Enterobacteriaceas resistentes aos carbapenemos em hospitais de Cuidados de Agudos* (2017)
45. Quale J. and Spelman D., 2019. *Overview of carbapenemase-producing gram-negative bacilli*. UptoDate
46. Rodríguez-Baño J., Cisneros J.M., Cobos-Trigueros N., Fresco G., Navarro-San Francisco C., Gudiol C., Horcajada J.P., López-Cerero L., Martínez J.A., Molina J., Montero M., Paño-Pardo J.R., Pascual A., Peña C., Pintado V., Retamar P., Tomás M., Borges-Sa M., Garnacho-Montero J. and Bou G.; Study Group of Nosocomial Infections (GEIH) of the Spanish Society of Infectious Diseases, Infectious Diseases (SEIMC), 2015. *Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology*. EnfermInfeccMicrobiolClin. 33(5):337.e1-337.e21
47. Sahuquillo-Arce J.M., Hernández-Cabezas A., Yarad-Auad F., Ibáñez-Martínez E., Falomir-Salcedo P. and Ruiz-Gaitán A., 2015. *Carbapenemases: A worldwide threat to antimicrobial therapy*. World J Pharmacol. 4(1): 75-95.
48. Senchyna F., Gaur R., Sandlund J., Truong C., Tremintin G., Küeltz D., Gomez C.A., Tamburini F.B., Andermann T., Bhatt A., Tickler I., Watz N., Budvytiene I., Shi G., Tenover F.C. and Banaei N., 2018. *Diverse Mechanisms of Resistance in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae at a Health Care System in Silicon Valley, California*. <https://doi.org/10.1101/298513>

49. Senchyna F., Gaur R.L., Sandlund J., Truong C., Tremintin G., Küeltz D., Gomez C.A., Tamburini F.B., Andermann T., Bhatt A., Tickler I., Watz N., Budvytiene I., Shi G., Tenover F.C. and Banaei N., 2019. *Diversity of resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a health care system in Northern California, from 2013 to 2016*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*93(3):250-257
50. Singh-Moodley A. and Perovic O., 2018. *Phenotypic and genotypic correlation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and problems experienced in routine screening*. *S Afr Med J.* 108(6):495-501.
51. Sousa J., 2005. *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto. 107-211.
52. Sousa J., Machado E., Novais C., Peixe L., Amorim J. and Monteiro N., 2016. *Antibióticos*. Edições Universidade Fernando Pessoa.
53. Stuart J.C., Voets G., Scharringa J., Fluit A.C. and Leverstein-Van Hall M.A., 2012. *Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray*. *J Med Microbiol.* 61(Pt 6):809-812.
54. Tamma P.D. and Simner P.J., 2018. *Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates*. *J ClinMicrobiol.* 56(11):1-13.
55. Ventola C.L., 2015. *The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats*. *P.T.* 40(4):277-283.
56. Wendel A., Brodner A., Wydra S., Ressina S., Henrich B., Pfeffer K., Toleman M., and MacKenzie C., 2013. *Genetic Characterization and Emergence of the Metallo- $\beta$ -Lactamase GIM-1 in Pseudomonas spp. and Enterobacteriaceae during a Long-Term Outbreak*. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(10): 5162-5165.
57. Yamada K., Kashiwa M., Arai K., Nagano N. and Saito R., 2016. *Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. *J. Microbiol Methods.* 128:48-51.
58. Yan Y.Z., Sun K.D., Pan L.H., Fan H.Q., Yang H.Z., Lu Y.C. and Shi Y., 2014. *A screening strategy for phenotypic detection of carbapenemase in the clinical laboratory*. *Can J Microbiol.* 60(4):211-215.
59. Zhang W., Guo Y., Li J., Zhang Y., Yang Y., Dong D., Zhu D., He P. and Hu F., 2018. *In vitro and in vivo bactericidal activity of ceftazidime-avibactam against Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Resist Infect Control.*7:142. doi: 10.1186/s13756-018-0435-9