

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS
CARBAPENÊMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jaciane Baggio Marques

Santa Maria, RS, Brasil

2014

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

Jaciane Baggiotto Marques

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM – RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos
Co-orientador: Prof^o Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS
RESISTENTES A OSCARBAPENÊMICOS**

elaborada por
Jaciane Baggiotto Marques

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marli Matiko Anraku de Campos, Dra.(UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Roberto Christ Vianna Santos, Dr.(UNIFRA)
(Co-orientador)

Sandra Trevisan Beck, Dra.(UFSM)

Alexandre Vargas Schwarzbald, Dr.(UFSM)

Santa Maria, 30 de abril de 2014.

Dedico este trabalho a minha família pelo incentivo, amor e dedicação, especialmente aos meus pais que não mediram esforços para a minha formação e as pessoas que conviveram comigo e de alguma forma acreditaram e incentivaram que este sonho se tornasse realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar em meu caminho e por ter me iluminado durante esta trajetória.

A minha Família que sempre se fez presente com incentivo e muito amor.

A minha mãe Jacira que foi a maior incentivadora, que sempre esteve ao meu lado, te admiro muito pela força e garra que tens de enfrentar a vida, e por ter batalhado muito para proporcionar o estudo que gostaria de ter tido.

Ao meu pai Paulo que considero muito como meu amigo, que amo muito, que sempre considerei como o homem mais sábio que existe, pois sempre foi ele que me amparou com seus conhecimentos.

A minha irmã Paula que sempre esteve ao meu lado, me apoiando quando necessário.

À lasmin minha sobrinha, que soube sempre me fazer sorrir nos momentos difíceis, a tia “Tete” te ama muito, e sempre vai estar ao teu lado para te proteger.

Ao meu companheiro Marino pelo amor, carinho e paciência. Obrigada por ter entrado em minha vida em um dos momentos mais difíceis, e mesmo assim soube me incentivar e apoiar muito. Saibas que é a pessoa que quero dividir minha vida, estando ao meu lado sempre. Eu te amo muito!

A minha orientadora, professora Dra. Marli Matiko Anraku de Campos, pela orientação, amizade, paciência, confiança, dedicação e apoio dado à realização deste trabalho. Minha admiração e gratidão.

Ao meu co-orientador, professor Roberto Christ Vianna Santos que de alguma forma sempre acreditou em mim, pelo apoio quando precisei, e por ter sido o meu primeiro exemplo de admiração e paixão pela profissão que escolhi. Muito obrigada!;

À professora Priscila por compartilhar seus conhecimentos.

Ao professor Bruno pela ajuda e disposição.

À toda minha família, tios e primos que de alguma forma torceram pelo meu sucesso e vitória.

À família do meu namorado, muito obrigada pelo carinho e incentivo.

As minhas amigas de coração que sempre estiveram ao meu lado e de que alguma forma não pude estar do lado delas o tempo inteiro mas mesmo assim,

adoro vocês minhas companheiras de longa data Tanise Dalmolin, Michele Rosa, Anelise Hundertmarck, Camila, Giana e Mariana Crauss. Saudades sempre!

Aos meus queridos companheiros de laboratório Tanise, Vanessa A., Pauline, Bianca, Grazi, Caren, Fallon e Vanessa que sempre se dedicaram em ajudar, incentivar, e conviver;

A Tanise por sempre se fazer presente nos meus momentos difíceis que levo como uma grande amiga, a Vanessa A. pela sua sabedoria e grande coração em ajudar as pessoas, a Pauline pelo carinho e pelo incentivo, a Grazi e Bianca pela ajuda com o material e sempre me dando o apoio de que precisei. Obrigada esse trabalho tem grande participação de vocês!

Aos Professores do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos funcionários do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT-UFSM).

À Sirlei, uma pessoa com grande coração.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM), por cederem as amostras clínicas e dividirem os seus conhecimentos com nosso laboratório;

À Universidade Federal de Santa Maria.

Ao CNPq e à CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedido.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e não estão nominalmente citados.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES ÀS ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

AUTORA: Jaciane Baggiotto Marques

ORIENTADORA: Marli Matiko Anraku De Campos

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de abril de 2014.

As enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos causam grande impacto para a saúde pública devido a seus diferentes mecanismos evolutivos de resistência. Um dos principais mecanismos relatados é a produção de carbapenemases, que são enzimas que atuam hidrolisando os antibacterianos carbapenêmicos como meropenem, ertapenem e imipenem. A detecção dessas enzimas é um desafio encontrado em muitos laboratórios de rotina de microbiologia clínica devido à demora na obtenção dos resultados e à utilização de métodos pouco sensíveis. Este trabalho teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos, provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário de Santa Maria-RS, no período de março a abril de 2013. Foram incluídas enterobactérias com o perfil de resistência carbapenêmicos (ertapenem, meropenem e imipenem), cujo teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado por método automatizado Vitek® 2 (BioMérieux) e/ou por ensaio de disco difusão, provenientes de qualquer sítio de isolamento. Os isolados foram submetidos ao teste modificado de Hogde (MHT) e, a seguir, foi realizada pesquisa dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{SPM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*, por PCR. Dentre os isolados clínicos submetidos ao MHT, 62,5% (n=20) apresentaram positividade, indicando a produção de carbapenemase. Ainda sobre o total de microrganismos estudados, o teste genotípico evidenciou que o *bla_{KPC}* foi o gene mais encontrado, em 31% (n=10) das amostras, seguido de *bla_{IMP}* em 12,5% (n=4) amostras. Os resultados obtidos demonstram que o uso conjunto de distintas metodologias se faz necessário para identificar a resistência aos carbapenêmicos produzida pelas enterobactérias, de modo a auxiliar o controle de infecção na prevenção da disseminação desses microrganismos.

Palavras-chave: Enterobactérias; Carbapenemases; Métodos fenotípicos; Métodos Moleculares.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ENTEROBACTERIACEAE RESISTANT TO CARBAPENEMIC ANTIMICROBIANS AT THE UNIVERSITY HOSPITAL OF SANTA MARIA

AUTHOR: Jaciane Baggiotto Marques
ADVISER: Marli Matiko Anraku De Campos
Presentation date: Santa Maria, April 30th 2014.

Enterobacteriaceae resistant to carbapenems cause great impact on public health due to their different evolutionary mechanisms of resistance. The mechanism of resistance that recently has been reported in Enterobacteriaceae is due to production of carbapenemases. Carbapenemases are enzymes that act against carbapenems such as meropenem, ertapenem, and imipenem. The most frequently reported are the metallo- β -Lactamases and serin-carbapenemases, which are classified according to their molecular structure. The detection of such enzymes is a challenge faced in many clinical laboratories due to the delay in obtaining results and use of not very sensitive methods. The present study aimed to characterize genotypic and phenotypically clinical isolates of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, during over seven months, isolated from inpatients at the University Hospital of Santa Maria. Results show that the modified Hodge (MHT) test is able to identify, in most cases, the strains producing any kind of resistance. Similarly, the search for genes - through PCR - was effective in identifying carbapenemase enzymes such as *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*. Therefore, none of these methods alone is enough for the detection of resistance mechanisms. Therefore, the combined use of the methods is needed to identify the resistance to carbapenems produced by enterobacteria to prevent its spread and promote the control of infections caused by these organisms.

Keywords: Enterobacteriaceae. Carbapenemase. Phenotypic methods. Molecular methods.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do MHT	31
--------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das enzimas carbapenemases de acordo com Ambler e Bush-Jacoby.....	20
Tabela 2: Iniciadores para identificação das serina-carbapenemases.....	32
Tabela 3: Iniciadores para identificação das Metallo- β -Lactamases.....	32
Tabela 4: Distribuição das espécies de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, isoladas no período de junho a dezembro de 2013, nos diferentes sítios de isolamento, de pacientes internados no HUSM.....	34
Tabela 5: Associação do MHT à presença dos genes <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{IMP}	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
AMOX+SULB	Amoxicilina + Sulbactam
AMIC	Amicacina
AMOX + AC	Amoxicilina + Ácido Clavilânico
Bla	Identificação Genética
CEFA	Cafalotina
CEFE	Cefepime
CEFT	Ceftriaxona
CEFU	Cefuroxima
CEFU + ACETIL	Cefuroxima + Acetil
CFTA	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIPRO	Ciprofloxacino
COLIS	Colistina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRE	Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERT	Ertapenem
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
EUA	Estados Unidos da América
GEN	Gentamicina
GES	Guiana-extended spectrum
GIM	Germany Inipenemase
IMI	Imipenem
IMP	Imipenemase
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
MBL	Metallo- β -lactamase
MDR	Enterobactéria multiresistente
MER	Meropenem
MHT	Teste Modificado de Hodge
NA	Ácido Nalidíxico
NDM	New Delhil imipenemase
NMC-A/IMI	Imipenem-hydrolyzing β -lactamase / Not metalloenzyme carbapenemase-A
NITRO	Nitrofurantoína
NOR	Norfloxacino
OXA	Oxacilinasas
PCR	Reação de Cadeia da Polimerase
PIPE + TAZO	Piperaciclina + Tazobactan
SME	Serratia marcenscens enzyme
SPM	São Paulo Imipenemase
TE	Tris-EDTA

TIG	Tigeclina
TSA	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana
TZB	Tazobactam
TRIM + SULFA	Trimetropim + Sulfametoxazol
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VIM	Verona Inipenemase

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM..... 60

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Quadro de resultados fenotípicos e genotípicos.....	52
Apêndice B – Quadro do perfil de suscetibilidade das amostras.....	54
Apêndice C – Foto teste modificado de Hodge.....	56
Apêndice D – Fotos dos géis de eletroforese.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Serina-carbapenemases	20
3.2 Metallo- β -lactamases	24
3.3 Detecção laboratorial	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Isolados Clínicos	30
4.2 Testes fenotípicos	30
4.3 Teste genotípico	31
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	37
7 CONCLUSÃO	41
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	42
APÊNDICES	51
ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

A resistência a antimicrobianos apresentada por enterobactérias vêm demonstrando um grande interesse por ocasionar graves problemas à saúde pública. Estes microrganismos têm se alastrado pelo mundo através surtos pandêmicos. Devido ao acúmulo de diferentes mecanismos de resistência, estes microrganismos exibem reduzido número de opções terapêuticas, o que acarreta elevada mortalidade (NORDMANN et al., 2013; BRASIL, 2013).

Dentre os mecanismos de resistência mais preocupantes encontrados em enterobactérias está a produção de carbapenemases. Este mecanismo veio contribuir com outros mecanismos de resistência já descritos em enterobactérias, como as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), tornando estes microrganismos resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis (LI et al., 2014).

Três grandes classes de carbapenemases são conhecidas as metalo- β -lactamases (IMP- imipenemase, VIM- Verona imipenemase, NDM –New Delhi imipenemase são as mais frequentes), as serina oxacarbapenemases (a mais constantemente relatada sendo OXA-48) e as serina carbapenemases do tipo *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) (BRASIL, 2013). Do ponto de vista epidemiológico estas enzimas são de extrema relevância, pois apresentam rápida e ampla disseminação. Esta propagação deve-se ao fato das enzimas serem codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, tornando-se umas das maiores preocupações em nível de infecção hospitalar pelo seu alto poder de difusão mundial (LUPO et al., 2013).

Dados referentes à disseminação de enterobactérias são escassos e relacionam-se principalmente à KPC. Neste sentido, um estudo realizado no sul do Brasil pesquisou a ocorrência do gene *bla*_{KPC} em enterobactérias, onde verificou-se a presença destes genes nas espécies *Klebsiella pneumoniae* (53%), *Serratia marscescens* (20%), *Enterobacter cloacae* (11%), *Enterobacter sp* (5%), *Escherichia coli* e *Klebsilla oxytoca* (2% cada); estas foram encontradas, principalmente, na urina e trato respiratório (ALVES & BEHAR, 2013).

No Brasil, desde a primeira detecção de KPC em 2006, esta tem se disseminado por todo o país, causando surtos relacionados a *K. pneumoniae* e outras enterobactérias. Outras enzimas já foram encontradas, como IMP, VIM e, mais recentemente, NDM (PEIRANO et al., 2009; PAVEZ et al., 2009).

A busca por enterobactérias produtoras de carbapenemases tem sido um desafio em muitos laboratórios de análises clínicas, onde os testes de detecção são baseados em disco difusão e microdiluição em caldo utilizando carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem). Outros métodos também são utilizados para fins epidemiológicos e para controle de infecções, como o teste modificado de Hodge (MHT) (PATEL, 2009; WANG et al., 2012; LITTLE et al., 2012).

Apesar destes testes fenotípicos serem amplamente utilizados, se faz necessária a confirmação da produção de enzimas de resistência a carbapenêmicos através de testes moleculares, como a reação de cadeia da polimerase (PCR), que apresenta alta sensibilidade e especificidade. A detecção de enterobactérias produtoras de carbapenemases é de extrema importância para o controle de infecção e prevenção da disseminação destes mecanismos de resistência. Por conseguinte, torna-se pertinente a implementação de métodos mais rápidos e sensíveis que os métodos laboratoriais fenotípicos atuais. O controle de infecções causadas por enterobactérias resistentes deve ser realizado com esforços multidisciplinares, incluindo medidas de detecção precoce do paciente colonizado e tratamento adequado, com o propósito de evitar a propagação da resistência (LUPO et al., 2013; BRASIL, 2013).

Neste contexto, é de fundamental interesse científico que estudos sejam realizados a fim de se conhecer os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos na resistência a carbapenêmicos. Da mesma forma, a avaliação da efetividade dos métodos utilizados se mostra necessária e pertinente, uma vez que a detecção incorreta dos mecanismos que conferem resistência aos antimicrobianos ocasiona problemas terapêuticos graves em humanos. Através desses novos conhecimentos será possível estabelecer estratégias capazes de controlar a disseminação de microrganismos resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotipicamente e molecularmente isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário de Santa Maria.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Identificar a resistência a carbapenêmicos através de testes fenotípicos;
- 2.2.2 Detectar os genes que codificam as carbapenemases;
- 2.2.3 Comparar a detecção da resistência a carbapenêmicos quando realizada por métodos fenotípicos e genotípicos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grupo heterogêneo de bacilos Gram-negativos. Os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter* e *Serratia* são os mais prevalentes (ROOLINS & JOSEPH, 2000). As enterobactérias são consideradas os agentes mais frequentes de infecções em humanos, tanto em infecções comunitárias como hospitalares. Além disso, esses microrganismos apresentam tendência de adquirir genes de resistência aos antimicrobianos, por transferência horizontal, facilitando a disseminação dos mesmos (NORDMANN & CORNAGLIA, 2012; LUPO et al., 2013) .

Microrganismos resistentes aos antimicrobianos vêm despertando grande interesse no meio científico, uma vez que podem originar problemas graves para a saúde pública. A associação entre o aumento da resistência a antimicrobianos e a facilidade de disseminação desses mecanismos de resistência devido à globalização podem ocasionar surtos pandêmicos. Além disso, o número reduzido de pesquisas de novos antimicrobianos e o número elevado de pacientes com doenças crônicas, portanto mais suscetíveis a infecções, geram, por conseguinte, preocupação a nível mundial (NORDMANN et al., 2013).

A resistência bacteriana é um mecanismo adaptativo de preservação da espécie, todavia, o uso abusivo, irracional e contínuo de antimicrobianos tem contribuído de forma preponderante para o aumento da resistência de várias bactérias (CHEN et al., 2013). Um dos mecanismos de resistência adquiridos na evolução adaptativa das bactérias foi a produção de β -lactamases pelas enterobactérias, as quais incluem β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e do tipo AmpC (SAVARD et al., 2013; HUSSEIN et al., 2009).

As ESBL foram descritas pela primeira vez na Alemanha em 1983 e nos Estados Unidos da América (EUA) em 1988, podendo ser encontradas em plasmídeos, capazes de hidrolisar as cefalosporinas de segunda e terceira geração e o aztreonam, porém são inibidas pelo ácido clavulânico. Com as opções terapêuticas restritas, o tratamento de infecções provocadas por enterobactérias produtoras de ESBL passou a ser realizado com a utilização de carbapenêmicos,

por estes apresentarem os melhores desfechos clínicos (HUSSEIN et al., 2009; SAVARD et al., 2013).

A utilização difundida de carbapenêmicos, juntamente com outros mecanismos de resistência – como modificação na permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo associados à hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC ou ESBLs e produção de β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos (carbapenemases) – levou à menor suscetibilidade das enterobactérias a esta classe de medicamentos, sendo estas, conhecidas e denominadas como Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos (CRE). Devido a isso, a disseminação desses microrganismos tem causado um grande número de surtos de infecções relacionadas a assistência a saúde (IRAS), assim como, tem ocasionado diversas mortes. Ademais, os gastos hospitalares atribuídos a infecções causadas pelas CRE são elevados em comparação a microrganismos não resistentes. Neste sentido, um estudo realizado nos EUA, comprovou que para bactérias resistentes carbapenêmicos, os custos oneraram cerca de 34 bilhões de dólares enquanto que para as não resistentes os gastos foram de \$ 21 bilhões (NORDMANN, 2013; DUIN et al., 2013).

Em 1980, Ambler propôs a classificação molecular das carbapenemases levando-se em consideração as características funcionais de cada microrganismo, assim como a sequência de aminoácidos presentes. A classificação se subdivide em classes A, B, C e D, sendo que as enzimas das classes A, C e D apresentam em seu sítio ativo uma serina e as da classe B, são compostas por metalo-enzimas, que possuem zinco como cofator enzimático, facilitando a hidrólise a β -lactâmicos. (NORDMANN, 2013; KRUSE et al., 2013; DUIN et al., 2013; LI et al., 2014).

A classificação mais recente das carbapenemases surgiu em 2009, denominada classificação funcional proposta por Bush & Jacoby. Esta classificação leva em consideração a classe de Ambler, porém é subdividida em subgrupos funcionais que independem da estrutura da enzima (tabela 1). Esta nova denominação elucida melhor as propriedades laboratoriais específicas observadas no perfil de resistência de cada isolado. A classificação de Bush & Jacoby acarreta em um aumento da classe de β -lactamases, já que leva em consideração a capacidade de inibição exercida pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam frente às β -lactamases. As carbapenemases, nesta nova classificação, são

encontradas nas classes moleculares A, B e D e principalmente nos subgrupos 2df, 2f e 3a/b (QUEENAN e BUSH, 2007; BUSH & JACOBY, 2009).

Classe molecular segundo Ambler (1980)	Subgrupos de acordo com Bush-Jacoby (2009)	Tipo de resistência	Inibidos por		Características	Enzimas
			AC ou TZB	EDTA		
A	2f	Carbapenemase	+	-	Alta hidrólise a carbapenêmicos	KPC
B (B1)	3a	Carbapenemase	-	+	Hidrólise de espectro estendido incluindo carbapenêmicos, mas não monobactâmicos	IMP, VIM e NDM
D	2df	Carbapenemase	+	-	Hidrólise de cloxacilina ou carbapenêmicos	OXA-48

Tabela 1: Classificação das enzimas carbapenemases de acordo com Ambler e Bush-Jacoby. Adaptado de Bush & Jacoby (2009).

AC: Ácido Clavulânico TZB: Tazobactam

3.1 Serina-carbapenemases

3.1.1 Classe A

São representantes desta família, a NMC-A/IMI (*Imipenem-hydrolyzing β -lactamase/Not metalloenzyme carbapenemase-A*), SME (*Serratia marcescens enzyme*), GES (*Guiana-extended spectrum*) e KPC (*K. pneumoniae carbapenemase*). Encontram-se na classe A de Ambler e pertencem ao grupo funcional 2f segundo Bush & Jacoby (2009) (QUEENAN & BUSH, 2007; BUSH & JACOBY, 2009).

As enzimas NMC-A, IMI e SME conferem perfil de resistência aos carbapenêmicos, penicilinas e aztreonam, mas apresentam sensibilidade às cefalosporinas de espectro estendido. A produção de SME se restringe a isolados de

S. marcescens em diferentes localizações geográficas, enquanto que IMI e NMC-A tem sido isoladas em *Enterobacter cloacae* nos EUA, França e Argentina (POTTUMARTHY et al., 2003; RADICE et al., 2004; QUEENAN et al., 2006).

Estas enzimas são cromossomais e podem ser induzidas pelo uso de imipenem e ceftoxitina. IMI, NMC-A e SME, por estarem nesta localização, não estão associadas a elementos móveis, justificando melhor o fato de não serem amplamente disseminadas. Apesar disso, o gene *bla_{IMI-2}* foi localizado em plasmídeos de *Enterobacter asburiae* nos Estados Unidos e em isolados de *E. cloacae* na China. A diferenciação entre elas baseia-se no perfil hidrolítico, onde IMI e NMC-A são inibidas pelo ácido clavulânico, característica que não é compartilhada pelas SME (QUEENAN & BUSH, 2007).

As enzimas GES são predominantemente encontradas em *Pseudomonas aeruginosa*, mas também muito frequentes em enterobactérias. Foi relatada pela primeira vez em *K. pneumoniae* na França, porém, tem sido identificada mundialmente com relatos de casos na Grécia, França, Portugal e Brasil. Nove variantes de GES já foram descritas e várias apresentam capacidade de hidrolisar imipenem. GES está localizada como cassetes em integrons podendo ser carregadas por plasmídeos. Integrons são elementos genéticos com um ou mais cassetes de genes, que usualmente podem carrear genes de resistência antimicrobiana (POIREL & NORDMANN, 2002; DUARTE et al., 2003; POIREL et al 2005; PASTERMAN, et al 2005; RYOO et al., 2005; PATEL, 2009).

Encontram-se também nesta classificação, as enzimas do tipo KPC, que se diferenciam das demais enzimas por serem inibidas pelo ácido clavulânico. Isto ocorre devido à diferença de afinidade da enzima em relação aos antimicrobianos. Normalmente são capazes de hidrolisar carbapenêmicos e todos os β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e aztreonam. Imipenem, meropenem, ertapenem, ceftazidima e aztreonam são hidrolisados com uma eficiência um pouco menor do que penicilinas e cefalosporinas de espectro limitado, conferindo a estas enzimas o perfil de espectro estendido (BRADFORD, 2004; NORDMANN et al., 2009).

Falhas na detecção de KPC tem sido bastante relatadas, pois estas enzimas podem equivocadamente ser confundidas com ESBLs. Isso acontece por compartilharem do mesmo mecanismo de hidrólise de cefalosporinas de espectro estendido, porém se diferenciam pela hidrólise de carbapenêmicos. A inibição pelo

ácido clavulânico foi demonstrada pela baixa nos valores de concentração inibitória mínima (CIM) após sua adição (YIGIT et al., 2001; QUEENAN & BUSH, 2007; NORDMANN et al., 2009; LEÃO et al., 2010).

A KPC foi relatada primeiramente na Carolina do Norte, em 1996, cujo gene foi localizado em plasmídeo, recebendo a denominação *bla*_{KPC}. O gene *bla*_{KPC} está diretamente ligado ao transposon (tn4401), facilitando sua disseminação. Os plasmídeos são segmentos de DNA que podem ser transferidos para outras bactérias, inclusive para diferentes espécies, contribuindo assim para o aumento e propagação da resistência. Após a descoberta dessa betalactamase mediada por plasmídeo, denominada KPC-1, seguiram-se diversos relatos de outra carbapenemase, denominada KPC-2, que variava em apenas um aminoácido. Depois de alguns anos, *bla*_{KPC-1} foi sequenciado novamente, revelando a perfeita similaridade com *bla*_{KPC-2} (NORDMANN et al., 2009; NORDMANN, 2013; SAVARD et al., 2013).

Atualmente, estão descritas 19 variantes de KPC, de KPC-2 até KPC-20, usualmente encontradas em enterobactérias (<http://www.lahey.org/studies/other.asp>), exceto KPC-5 que foi descrita em *P. aeruginosa*. Após seu surgimento, foram relatados vários surtos de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em diversos países. Entre os anos de 2006 e 2010 a prevalência de KPC passou de 1,3% para 15,2% na Itália e de 0,0% para 5,5% na Hungria. Outros países também reportam casos de KPC em *Klebsiella pneumoniae*, como a França, Reino Unido, Itália, Suíça, Noruega, Canadá, Colômbia, China e Brasil. O gene *bla*_{KPC} se tornou responsável por alguns surtos em Nova York e tem sido isolado em 42 estados nos EUA (NORDMAN, et al., 2013; SAVARD et al, 2013).

No Brasil, KPC foi encontrada primeiramente em Recife, em 2006, abrigando consigo outros genes de resistência. Após um mês da KPC-2 ter sido detectada em Recife, foi descrita também em seis isolados clínicos de hospitais do Rio de Janeiro. Há evidências que a KPC-2 produzida por *K. pneumoniae* tenha emergido no Brasil no ano de 2005. Em estudos seguintes foram identificados 32 isolados de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em 8 centros de saúde, sendo relatada a presença, nesses microrganismos, dos genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} (MBLs) e *bla*_{KPC} (PAVEZ et al., 2009; ROSSI, 2011).

Normalmente as enterobactérias produtoras de KPC encontram-se associadas a surtos de infecções hospitalares. Este fato leva a um agravamento ou

à piora do quadro clínico dos pacientes hospitalizados com doenças graves, em uso de dispositivos invasivos e amplamente expostos a antimicrobianos. A piora do quadro clínico está associada a longos períodos de hospitalização, juntamente com o aumento da mortalidade e morbidade. Esses isolados podem colonizar trato urinário, intestinal e respiratório. No entanto, as infecções da corrente sanguínea estão associadas com os valores mais elevados de mortalidade causados pela KPC, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Deste modo, demonstra-se a importância da rápida identificação de pacientes portadores de enterobactérias que contém a enzima KPC, bem como o isolamento destes (PEIRANO et al., 2009; NORDMANN et al., 2009; MUNOZ-PRICE & QUINNE, 2013).

3.1.2 Classe D

As Oxacilinasas (OXA) são β -lactamases classificadas molecularmente na classe D de Ambler e nos subgrupos 2d, 2de e 2df (BUSH & JACOBY, 2010). O subgrupo 2d inclui bactérias que são capazes de hidrolisar oxacilina e cloxacilina, apresentando baixa inibição pelo ácido clavulânico e EDTA, porém são inibidas por NaCl. O subgrupo 2de inclui enzimas capazes de hidrolisar cloxacilina ou oxacilina, com espectro estendido a oxi-imino-betalactâmicos, porém não hidrolisam carbapenems. O subgrupo 2df compreende as enzimas OXA que hidrolisam carbapenêmicos. Ocorrem mais frequentemente em isolados de *Acinetobacter baumannii*, onde tem localização cromossomal, embora as enzimas OXA-23 e OXA-48 tenham sido relatadas associadas a plasmídeos em enterobactérias.

A primeira OXA, descrita em 1993, hidrolisava bem as penicilinas, mas não o imipenem. Desde então, um grande número de surtos têm sido reportados no Brasil, Coréia, Taiti, Espanha e Portugal (QUEENAN & BUSH 2007; BUSH & JACOBY, 2010).

A enzima OXA-48, pertencente ao subgrupo 2df, possui a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos como imipenem e meropenem, sendo este último hidrolisado mais fortemente. Esta enzima pode apresentar localização plasmideal de enterobactérias e possui a habilidade de hidrolisar cerca de 40 a 50% mais

rapidamente as benzilpenicilinas ou oxacilinas do que os carbapenêmicos e não respondem à inibição por ácido clavulânico (RAMUSSEN & HØIBY, et al., 2006).

A OXA-48 tem sido detectada em microrganismos ambientais, sendo geralmente encontrada em conjunto com outros genes de resistência. Na Turquia, esta enzima foi detectada em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, contudo, OXA-48 ainda não foi identificada no Brasil (MACGOWAN & MACNAUGHTON, 2013; NORDMANN et al., 2013; BRASIL, 2013).

3.2 Metallo- β -lactamases

As metallo- β -lactamases representam a classe molecular B de Ambler, de acordo com sua estrutura são subdivididas em B1, B2 e B3; já a classificação funcional de Bush & Jacoby subdivide essas enzimas nos grupos 3a e 3b. O subgrupo 3a compreende as metallo β -lactamases mais encontradas, denominadas IMP e VIM, que aparecem frequentemente em enterobactérias. Estão na classe molecular B1 de espectro estendido, sendo observadas pela hidrólise de penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos; apresentam baixa afinidade ou capacidade de hidrólise dos monobactâmicos (BUSH & JACOBY, 2009).

Essas enzimas são diferenciadas pela sua estrutura, pois requerem zinco para sua atividade. Algumas destas enzimas são capazes de hidrolisar carbapenêmicos e tem baixa afinidade para hidrolisarem monobactâmicos. Não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam, mas são inibidas por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os primeiros microrganismos a apresentar esses genes de resistência foram microrganismos ambientais oportunistas (RICCIO et al., 2000; MARCHIARO et al., 2008).

As metallo enzimas incluem VIM (Verona imipenemase), IMP (imipenemase), GIM (Germany imipenemase), SPM (São Paulo imipenemase) e a NDM (New Delhi imipenemase) e todas são carregadas por plasmídeos, sendo então, de fácil transmissão. A enzima IMP foi encontrada pela primeira vez na Europa em *A. baumannii*, se propagando para países como EUA e Austrália. A enzima VIM foi isolada inicialmente na Itália, em 1997, em *P. aeruginosa*. A SPM foi descoberta em São Paulo, em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, em múltiplos hospitais,

ocasionando surtos com dados de alta mortalidade. A GIM foi primeiramente isolada na Alemanha, em 2002. Desde a descoberta de GIM e SPM, elas não têm se propagado fora de seu país de origem. VIM e IMP continuam sendo detectadas por todo o mundo, com tendência a se moverem entre *Pseudomonas* e enterobactérias (QUEENAN & BUSH, 2007).

A enzima IMP é mais encontrada no Japão, sendo a primeira reportada na China, em 2006. Na Itália tem sido quase que contínua a detecção de isolados contendo os genes VIM e IMP. Nos Estados Unidos, em 2001, tanto VIM quanto IMP foram reportadas, inclusive com relato de um surto clonal em 17 pacientes. Em 2004, o mesmo ocorreu no Canadá e na Austrália (WALSH, 2005).

As enzimas IMP são diferenciadas de acordo com a variação de aminoácidos em sua estrutura, sendo divididas em 3 grupos. O primeiro grupo inclui IMP1, IMP-3 até IMP-7 com 90-99% de sua cadeia de aminoácidos idênticos. O segundo grupo está representado pelas enzimas IMP-2 e IMP-8, que se diferenciam em somente dois aminoácidos. Entre o primeiro e o segundo grupo existe uma diferença de 84% a 88% na cadeia de aminoácidos. A IMP-9 é a única representante do terceiro grupo que tem em torno de 87 a 86% de aminoácidos idênticos a IMP-1 e IMP-2 (NORDMANN & POIREL, 2002).

A enzima IMP-3 foi descrita no Japão diferenciando-se de IMP-1 em apenas dois aminoácidos. A capacidade hidrolítica de IMP-3 não apresenta grande significância, pois sua atividade é muito reduzida frente às benzilpenicilinas, ampicilinas, ceftazidima e imipenem. Desta forma, se sugere que IMP-3 seja a progenitora de IMP-1. Em 1997, foi isolada na Itália uma variante de IMP-1 a IMP-2 em *A. baumannii*. A enzima IMP-2 diferencia-se das outras enzimas pela hidrólise de penicilinas, carbenicilina, cefaloridina e meropenem. Entre 1994 e 1998 foi descrita a variante IMP-4, recuperada de amostras sanguíneas em Hong Kong. Este isolado apresentou resistência a muitos β -lactâmicos, incluindo o imipenem. Dados da literatura demonstram que estas variantes de IMP-1 a IMP-9 já foram descritas em microrganismos diferentes e em vários países (RICCIO et al., 2000; IYOBE et al., 2000; POIREL & NORDMANN, 2002).

Assim como IMP, VIM também apresenta variações. Após o relato de VIM-1, foi descrita VIM-2 no sul da França, em isolados de *P. aeruginosa*. Porém, estes apresentavam um perfil hidrolítico de amplo espectro, mas ainda suscetível a aztreonam. VIM-1 e VIM-2 compreendem 90% de seus aminoácidos iguais, sua

diferença pode ser funcionalmente relevante já que seus perfis de hidrólise são similares a muitos β -lactâmicos. A variante VIM-3 foi descrita em Taiwan em *P. aeruginosa*, com variação de apenas dois aminoácidos em relação a VIM-2. Os relatos destas enzimas fora de seus países de origem suportam a idéia de propagação mundial de carbapenemases (POIREL & NORDMANN, 2002;).

A última metalobetalactamase descrita foi a NDM, relatada inicialmente na Índia em *K. pneumoniae*, isolada na Urina. Usualmente são resistentes a todos os antimicrobianos exceto tigeciclina e colistina. Foram isoladas também no Paquistão e Reino Unido em várias espécies de Gram negativas. Esta enzima tem sido reportada em países como Gram Bretanha, Canadá, África do sul, Quênia, Arábia Saudita, Malásia, Austrália, entre outros. Somente nos EUA já foram relatados 13 casos, todos envolvendo a hospitalização do paciente (SHOMA et al., 2013, NORDMANN, 2013;SAVARD et al., 2013)

Na América do Sul, as enzimas mais encontradas são SPM e VIM, na Argentina, Chile, Venezuela e na Colômbia. SPM foi detectada na Europa proveniente de um paciente que esteve sob cuidados médicos no Brasil, mostrando assim, que sua propagação tem sido reportada somente em seu país de origem e em países vizinhos. Alguns casos de *K. pneumoniae* produtoras de metalo- β -lactamase IMP-1 foram reportados no Brasil. Em 2013, pela primeira vez, a NDM foi descrita em nosso país. Foi detectado um caso de NDM-1 no estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, em isolados de *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae* (ROSSI, 2011; BRASIL, 2013; CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

3.3 Detecção laboratorial

A detecção de enterobactérias produtoras de carbapenemases é considerada um desafio nos laboratórios de rotina, devido a esses microrganismos expressarem resistência heterogênea aos β -lactâmicos e apresentarem resistência variável aos diferentes carbapenêmicos. Os pontos de corte ou CIM são estabelecidos por manuais publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que são adotados no Brasil (SAVARD et al., 2013).

A técnica mais utilizada para determinação de suscetibilidade aos antimicrobianos em laboratórios de rotina é o ensaio de disco difusão. Para detecção da produção de carbapenemases utiliza-se discos impregnados com ertapenem, pois essa droga tem demonstrado ser o indicador mais sensível (NORDMANN et al., 2009). Porém, essa metodologia possui baixa especificidade quando outros mecanismos estão envolvidos, como por exemplo, a perda de porinas, efluxo e super-expressão de ESBL ou AmpC (SAVARD et al., 2013). Apesar da escassez de estudos comparando a sensibilidade dos diferentes testes de suscetibilidade, alguns trabalhos comprovam elevada sensibilidade de testes de triagem baseados em CIM em relação aos testes de disco-difusão ou de gradiente de concentração (E-test) (QUEENAN & BUSH, 2007; KRUSE et al., 2013).

Anteriormente a 2010, o CLSI recomendava o MHT como teste para confirmação de suspeitas de CRE. Nesse teste utiliza-se uma cepa sensível de *E. coli* ATCC 25922 e um disco de meropenem ou ertapenem. As placas são examinadas pela ausência ou presença de crescimento da cepa *E. coli*, com zona de inibição na inserção com o isolado testado, confirmando a produção de carbapenemase. Uma das limitações da técnica é que no máximo quatro isolados podem ser testados em uma mesma placa. Esse teste é relativamente barato e de fácil execução na ausência de métodos mais sofisticados. Outras limitações incluem: o fato de que não se pode diferenciar os mecanismos de resistência; o tempo para realização do teste é relativamente longo; e sua interpretação pode necessitar de experiência técnica para diferenciar em cepas que apresentam resistência ou não (KRUSE et al., 2013).

O método modificado de Hodge vem apresentando falta de especificidade para a detecção de enzimas como NDM e VIM. Savard et al. (2013) cita a baixa sensibilidade (em torno de 50%) do teste de Hodge para detecção de NDM. Desse modo, outros métodos tem sido recomendados para a confirmação da produção de carbapenemases, como testes de inibição através de discos como ácido fenilborônico e EDTA. Sendo utilizado como método de confirmação para KPC, o ácido fenilborônico apresenta sensibilidade de 100% e especificidade de 98-100%. O EDTA tem sido empregado, com bons resultados, para a identificação de metalo- β -lactamases (KRUSE et al., 2013).

O CLSI, em 2010, estabeleceu novos pontos de corte para detecção de resistência aos carbapenêmicos. O ponto de corte para resistência ao ertapenem foi

alterado de $\geq 8\mu\text{g/mL}$ para $\geq 1\mu\text{g/mL}$; imipenem de $\geq 16\mu\text{g/mL}$ para $\geq 4\mu\text{g/mL}$; e meropenem de $\geq 16\mu\text{g/mL}$ para $\geq 4\mu\text{g/mL}$.

De acordo com os novos critérios estabelecidos pelo CLSI, o teste de confirmação pelo MHT já não se faz necessário para rotina de identificação de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos. O teste é recomendado somente com finalidade epidemiológica para o controle de infecção. A fim de se obter resultados mais concisos e específicos, a técnica de PCR é recomendada como padrão ouro na identificação de isolados produtores de carbapenemases. Além disso, a detecção adequada dos genes que codificam essas enzimas torna-se essencial para que sejam propostas medidas de controle de infecção, bem como seja estabelecida a melhor escolha de terapia antimicrobiana (WANG et al., 2012; LITTLE et al., 2012).

A detecção da resistência a antimicrobianos requer uma atenção maior devido à urgência no diagnóstico, em particular, da presença dos genes de resistência *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* e *bla_{OXA}*. O ideal seria que a investigação desses genes fosse realizada por métodos de fácil implementação e manuseio. O método deve ter a capacidade de identificar variantes fenotípicas de resistência, ou seja, um método rápido, preciso (sensível e específico) e versátil, que possa ser implementado e evoluir de acordo com a resistência apresentada por estes microrganismos frente ao uso de antimicrobianos (WALSH, 2010; BUSH et al., 2013; HAMPRECHT et al., 2013).

Os testes moleculares têm sido muito utilizados na identificação de carbapenemases, baseando-se na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), apresentando alta especificidade para a confirmação de CRE. Esses testes são considerados o padrão ouro para a especificação e identificação de carbapenemases, mesmo existindo diversos outros testes comerciais para identificação de CRE (KRUSE et al., 2013).

A PCR é muito utilizada em estudos epidemiológicos para a verificação de resistência aos antimicrobianos. É a técnica mais rápida para identificar carbapenemases, podendo identificar grupos e sub-grupos em pouco tempo. Seu princípio começa pela amplificação de genes alvo. É um método muito utilizado na investigação da propagação de genes clonais em surtos (LUPO et al., 2013).

A PCR multiplex permite a amplificação de diferentes alvos genéticos em uma mesma reação. O seu desenvolvimento requer algumas exigências: a) alta especificidade dos *primers*; b) ausência de anelamento entre os *primers*; c)

condições de temperatura de reação idênticas para todos os *primers*; d) tamanhos de *amplicons* que permitam a diferenciação direta dos mesmos (MARKOULATOS et al., 2002).

Uma vez demonstrada a importância epidemiológica das CRE e as dificuldades encontradas nos laboratórios clínicos para diferenciação dos mecanismos de resistência por métodos fenotípicos, evidencia-se a importância da utilização dos testes moleculares para detecção dos genes de resistência.

A identificação molecular desses genes é uma ferramenta essencial para a melhor compreensão da epidemiologia das CRE. Tais dados poderão ser de grande valia para auxiliar a prevenção e controle de infecção, colaborando para otimização da mobilização de esforços e recursos humanos e materiais, contribuindo para a excelência dos serviços no Hospital Universitário de Santa Maria.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados Clínicos

Os isolados clínicos de CRE são provenientes do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), coletados no período de junho a dezembro de 2013. Foram analisadas 32 amostras de culturas positivas advindas de qualquer sítio de infecção, identificadas por meio de método automatizado Vitek ® 2 (BioMérieux) e/ou por ensaio de disco difusão. Para a realização dos experimentos foi incluída apenas a primeira cultura positiva de pacientes que possuíam mais de uma amostra positiva para CRE.

As culturas foram transportadas para o Laboratório de Micobacteriologia do Departamento de Análises Clínicas da UFSM (DACT-UFSM), para realização do MHT e PCR para detecção de carbapenemases. As bactérias foram armazenadas à -80°C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) suplementado com glicerol para futuros processamentos.

4.2 Teste Modificado de Hodge (MHT)

O MHT foi realizado conforme descrito pelo CLSI (2013). O teste foi conduzido utilizando-se discos de ertapenem (10 µg) ou meropenem (10 µg), a cepa padrão *E.coli* (ATCC 25922) e a cepa *K. pneumoniae*, utilizada como controle positivo. Esta última, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Ana Sara Levin, do Laboratório de Investigação Médica (LIM54) – Laboratório de Bacteriologia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O inóculo da cepa *E. coli*, correspondente à escala 0,5 de McFarland - preparado por meio de suspensão direta da colônia e diluído na proporção 1:10 - foi semeado em placa de ágar Müeller-Hinton. Após a semeadura, um disco de ertapenem ou meropenem foi adicionado no centro da placa.

Com auxílio de uma alça de platina, o controle positivo e as amostras foram estriados da borda do disco de β -lactâmico até a periferia da placa, tendo-se o cuidado de não tocar o disco. Após incubação à temperatura de $35\pm 2^\circ\text{C}$, por 16 a 20 horas, observou-se o crescimento da *E. coli* no halo de inibição do β -lactâmico e avaliou-se a ocorrência da distorção do halo de inibição das amostras testadas conforme exibido na figura 1.

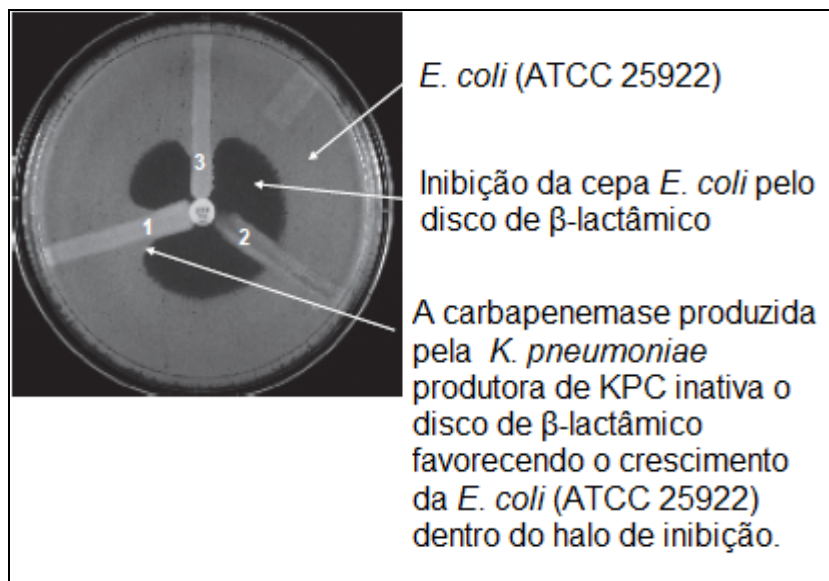


Figura 1: Representação do MHT (Adaptado de CLSI, 2013.)

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes codificadores de carbapenemases

A extração de DNA foi realizada por meio da técnica de fervura descrita por Woodford & Johnson, 1998. Em um microtubo de centrífuga, foram adicionados 100 μL de tampão Tris-EDTA (TE) e uma alçada de bactéria proveniente de cultura previamente semeada em placa contendo ágar Mueller Hinton. A suspensão foi aquecida a 100°C por 10 minutos. Em seguida, 900 μl de água ultra pura estéril foram adicionados e, posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos.

Todos os isolados de enterobactérias com perfil de resistência a carbapenêmicos foram submetidos à PCR para a investigação dos seguintes genes que codificam carbapenemases: *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e

*bla*_{GIM}. Para as PCRs foram utilizados os pares de iniciadores demonstrados nas tabelas 2 e 3. A identificação dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM} foi realizada pela técnica de PCR e para a detecção dos genes *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{GIM} utilizou-se PCR multiplex. Em ambas as reações utilizou-se o kit LGC Biotecnologia PCR 2x. As cepas utilizadas como controle positivo para as reações foram cedidas pela Profa. Dra. Anna Sara Levin, provenientes da coleção de cultura do LIM54/FMUSP.

Tabela 2: Iniciadores para identificação das serina-carbapenemases.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores 5'-3'	Tamanho de Amplicon PB	Referência
<i>bla</i> _{KPC-F} <i>bla</i> _{KPC-R}	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	795 pb	Lomaestro et al. 2006
<i>bla</i> _{OXA-48-F} <i>bla</i> _{OXA-48-R}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438 pb	Poirel et al., 2011

Tabela 3: Iniciadores para identificação das Metalo-β-Lactamases.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores 5'-3'	Tamanho de Amplicon pb	Referência
<i>bla</i> _{NDM1F} <i>bla</i> _{NDM1R}	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621 pb	Nordmann et al., 2010
<i>bla</i> _{SPM1F} <i>bla</i> _{SPM1R}	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798	Mendes et al., 2007
<i>bla</i> _{IMP1F} <i>bla</i> _{IMP1R}	GAATAG(A/G)(A/G)TGGCTTAA(C/T)TCTC CCAAAC(C/T)ACTA(G/C)GTTATC	188	Mendes et al., 2007
<i>bla</i> _{VIM1F} <i>bla</i> _{VIM1R}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGAGCACCAGGATAG	382	Mendes et al., 2007
<i>bla</i> _{GIM1F} <i>bla</i> _{GIM1R}	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC CGGAACGACCATTTGAATGG	72	Mendes et al., 2007

As condições das reações para detecção dos diferentes genes foram realizadas de acordo com os protocolos previamente publicados, conforme as referências citadas nas tabelas 1 e 2, com algumas modificações, a saber. As condições de PCR para a detecção dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM} e demais metalo-betalactamases ocorreram nos seguintes parâmetros: desnaturação a 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 5 minutos, anelamento a 58°C por 30 segundos

e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos de um extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram adicionados de GelRed™ (Biotium) e *gel loading buffer 6x* e foram submetidos à eletroforese em de gel de agarose 1,5% (p/v) 110V/cm. Os géis foram visualizados sob transiluminação UV (Rofer MacroVue UV20) e fotografadas com auxílio do equipamento Loccus Biotecnologia LPix® e *software* L-Pix Image ST®.

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob parecer CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) número 27094514.7000-5346.

5 RESULTADOS

Durante o período de estudo foram avaliados 32 isolados que apresentaram resistência à carbapenêmicos (apêndice B). A partir da análise dos prontuários dos pacientes pode-se associar as espécies de enterobactérias e seus respectivos sítios de isolamento. Dentre essas, a espécie mais frequente, *K. pneumoniae*, foi mais isolada de fezes e urina e *K. oxytoca*, em sangue, secreção traqueal e escarro. Estes dados estão exibidos na figura 2.

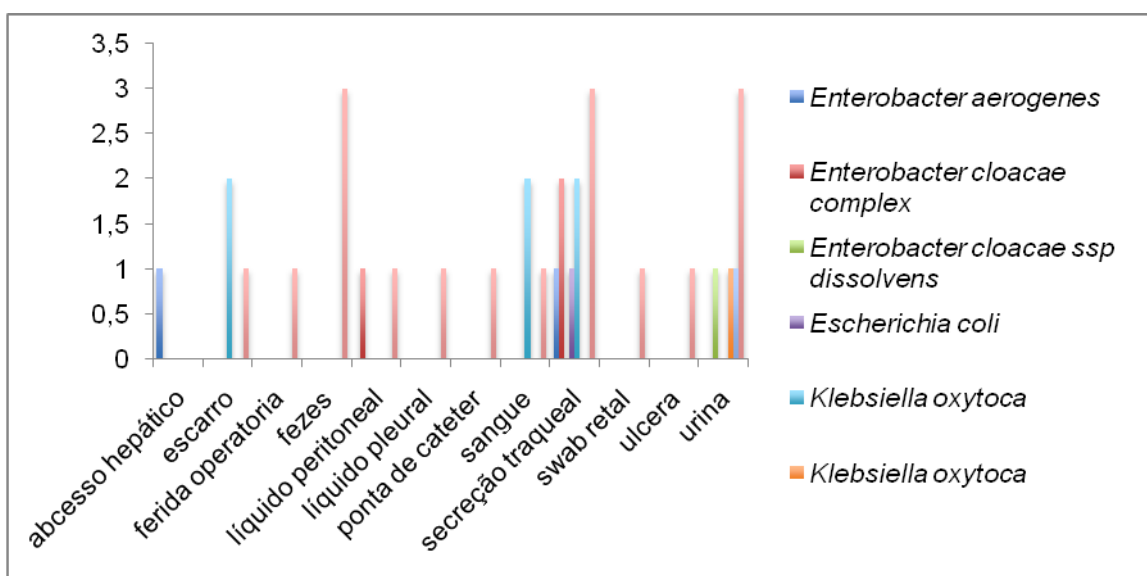


Figura 2: Distribuição das espécies de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, isoladas no período de junho a dezembro de 2013, nos diferentes sítios de isolamento, de pacientes internados no HUSM.

Todos os isolados foram analisados por testes fenotípicos e genotípicos para a detecção de resistência. Inicialmente foram submetidos ao MHT e depois ao teste genotípico. Foram pesquisados sete genes responsáveis pela resistência a carbapenêmicos (*bla_{KPC}*, *bla_{SPM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*).

Os dados sobre a resistência à ertapenem, imipenem e meropenem de cada isolado clínico foram associados com os resultados obtidos no MHT e com a presença do gene *bla_{KPC}*. Estas informações estão expostas na tabela 4, onde foram observados 12 diferentes perfis de resistência.

Tabela 4: Perfis dos isolados de acordo teste de sensibilidade aos carbapenêmicos, MHT e gene *bla*_{KPC}.

ESPÉCIE	ERT R IMI R MER R				ERT R IMI S MER R	ERT R IMI S MER S	ERT R IMI NT MER R			ERT R IMI NT MER S	ERT S IMI R MER R	ERTS IMI S MER R	TOTAL
	MHT (-)	MHT (-)	MHT +	MHT +	MHT (-)	MHT +	MHT (-)	MHT +	MHT +	MHT (-)	MHT +	MHT +	
	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} +	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} +	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} +	<i>bla</i> _{KPC} (-)	<i>bla</i> _{KPC} +	<i>bla</i> _{KPC} (-)	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1					1							2
<i>Enterobacter cloacae</i>						3	1						4
<i>Escherichia coli</i>											1		1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	1	3					1				7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4		4	4	1		2	1		1		1	18
TOTAL	6	1	5	7	1	4	3	1	1	1	1	1	32

(ERT R): resistente ao ertapenem; (ERT S): sensível ao ertapenem; (IMI R): resistente ao imipenem; (IMI S): sensível ao imipenem; (MER R): resistente ao meropenem; (MER S): sensível ao meropenem.

Dentre os isolados submetidos ao MHT, 62,5% (n=20) apresentaram positividade, indicando possível produção de carbapenemase (apêndice C). Ainda sobre o total de microrganismos estudados, os testes genotípicos evidenciaram que *bla_{KPC}* foi o gene mais encontrado, em 31% (n=10) das amostras, seguido de *bla_{IMP}* em 12,5% (n=4) amostras (apêndices B e D). Os dados obtidos da associação entre os resultados do MHT e a pesquisa dos genes de resistência *bla_{KPC}* e *bla_{IMP}* estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5: Associação do MHT à presença dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{IMP}*.

MHT	<i>bla_{KPC}/bla_{IMP}</i>		Total	
	NEGATIVOS	<i>bla_{IMP}</i> NEGATIVO		<i>bla_{IMP}</i> POSITIVO
Negativo	11	0	1	12
Positivo	11	6	3	20
Total	22	6	4	32

6 DISCUSSÃO

Este foi um estudo descritivo de amostras consecutivas de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, isoladas de diversos sítios de infecção, de pacientes atendidos no HUSM, ao longo de sete meses. A análise desses resultados leva a discussão de alguns aspectos.

Os resultados encontrados em nosso trabalho incluem urina, fezes e amostras do trato respiratório como os sítios mais acometidos. Além disso, *K. pneumoniae* foi a espécie mais frequente nos diversos sítios de isolamento, sendo principalmente em infecções de trato respiratório (figura 2). De modo similar, no estudo realizado por SHANMUGAM et al. (2013), os sítios de isolamento de microrganismos resistentes a carbapenêmicos mais reportados foram urina, pus, trato respiratório e sangue.

Atualmente existem diversos testes fenotípicos para a detecção de enterobactérias produtoras de carbapenemases. Estas técnicas incluem bioensaios que são capazes de detectar atividade hidrolítica das carbapenemases, contudo, não são eficazes para diferenciá-las. (DOYLE et al., 2012).

No presente trabalho, os isolados clínicos que demonstraram resistência ao ertapenem foram, em sua maioria, confirmados pelo MHT, permitindo inferir a produção de carbapenemases como mecanismo de resistência nos isolados em questão. Dois isolados que apresentaram MHT positivo não apresentaram resistência ao ertapenem. Porém, foram resistentes ao meropenem, demonstrando, desta forma, que o rastreio pode ser otimizado pela utilização combinada de dois carbapenêmicos (ertapenem combinado com imipenem ou meropenem) (PASTERAN et al., 2009; ANDERSON et al., 2007). Esses resultados também foram relatados em outros estudos (WANG et al., 2012; TZOUVELEKIS et al., 2012; BIRGY et al., 2012). Ainda que as novas diretrizes do CLSI tenham minimizado a importância dos testes fenotípicos para fins clínicos, a sua utilização para a identificação dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos pode auxiliar o controle de infecção (SEAH et al., 2011). Entre os testes de disco difusão, a resistência ao ertapenem é considerado o melhor indicador fenotípico para produção de KPC. No entanto, não demonstra ser muito específico. Contudo, o ensaio de

disco difusão apresenta-se como um dos únicos métodos recomendados pelo CLSI para fins de rastreio de carbapenemases na rotina (CLSI, 2013).

Os resultados aqui apresentados demonstram que houve concordância entre o MHT e o teste de genotípico em 50% das amostras (10 de 20 isolados com MHT positivo apresentaram o gene *bla_{KPC}*). Conforme a literatura, o MHT pode apresentar especificidade entre 90 a 100%. Neste contexto, diferentes estudos relatam divergências em se tratando da sensibilidade do MHT, isso ocorre devido a análise de distintas espécies e genes de resistência (XIA et al., 2012; CURY et al., 2012). Na análise realizada por Seah et al. (2011), ratificou-se que o MHT é um método sensível e capaz de detectar a atividade de carbapenemases em espécies de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*. Entretanto, este método deve ser utilizado com cautela, pois há a constante presença de resultados falso-positivos e também por não distinguir o tipo de carbapenemase envolvida. Pressupõe-se que estes resultados falso-positivos possam estar relacionados a outros mecanismos de resistência de enterobactérias (TSAKRIS et al., 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012; GAZIN et al., 2012).

Ainda neste contexto, estudos comprovam a baixa sensibilidade do MHT em detectar cepas produtoras de metalo- β -lactamases, pois estas exibem uma fraca atividade contra carbapenêmicos (PASTERAN et al., 2009; RAMANA et al. 2013). No presente estudo, o MHT não detectou um isolado portador do gene *bla_{IMP}*, o qual foi detectado pela PCR. Não é possível afirmar que o MHT foi capaz de identificar ou não metalo- β -lactamases, pois estudos com maior número de amostras se fazem necessários.

Estudos demonstram que o MHT não é um método sensível para NDM nem para OXA-48. Estirpes que contém OXA-48 podem apresentar resistência fraca aos carbapenêmicos não havendo, por conseguinte, nenhum teste fenotípico capaz de detectá-la. Não foi possível confirmar tais resultados, pois não foram encontrados isolados portadores desses genes. Apesar de NDM já ter sido descrita no Brasil, inclusive no Rio Grande do Sul, esse gene não foi encontrada nos isolados (BIRGY et al., 2012; RASHEED et al., 2013; BRASIL, 2013;).

A variabilidade demonstrada pelos testes fenotípicos, tanto com ertapenem como pelo MHT significa que não é recomendável empregar critério único de triagem para carbapenemase. Desse modo, o teste confirmatório por PCR é essencial, pois é capaz de contornar os problemas enfrentados quando utilizam-se métodos

fenotípicos, incluindo a redução do tempo de detecção. Ensaios de PCR simples para um único tipo de carbapenemase têm sido amplamente utilizados com sucesso em numerosos estudos. Tanto a PCR simples quanto a PCR multiplex vêm demonstrando ótimos resultados. Uma dificuldade enfrentada na realização dessa técnica refere-se a variedade de genes de resistência a serem detectados, que encontra-se pré-definida, podendo haver falhas de detecção de novos genes ainda não descritos (TZOUVELEKIS et al., 2012). No trabalho foi possível, por meio de ambas as técnicas moleculares, detectar a presença de dois genes de resistência (*bla_{KPC}* e *bla_{IMP}*), os quais foram encontrados associados em três isolados de *K. oxytoca* e um isolado de *K. pneumoniae*. Tais genes já foram descritos anteriormente no Brasil (MENDES et al., 2007; PAVEZ et al., 2009; POIREL et al., 2011).

Quando associou-se o MHT a detecção dos genes de resistência, foram observados doze perfis diferentes, que foram agrupados em quatro grupos principais demonstrado na tabela 4.

O primeiro grupo compreende as amostras onde o método fenotípico (MHT) foi capaz de identificar carbapenemases sendo confirmadas posteriormente pelos métodos moleculares.

O segundo grupo é composto pelos resultados positivos do MHT, porém não foi possível observar a presença de nenhum dos genes pesquisados. Neste grupo encontrou-se resultado falso-positivo para carbapenemases apresentado pelo MHT, o que pode ocorrer devido a outros mecanismos de resistência estarem envolvidos em enterobactérias, entre eles a expressão de ESBL, a hiperprodução de AmpC, presença de bombas de efluxo e perda de porinas (TZOUVELEKIS et al., 2012; GAZIN et al., 2012).

O terceiro grupo compreende um número pequeno de amostras, os quais representam o oposto do segundo grupo, onde o MHT confirmou sua falta de sensibilidade, não detectando genes que foram positivos pela PCR.

O quarto grupo abrangeu as amostras com resultados negativos tanto no MHT como nos testes moleculares, mostrando assim que estes isolados ainda podem apresentar algum outro mecanismo de resistência que não envolvam carbapenemases, pois esses isolados apresentavam resistência a pelo menos um carbapenêmico no teste de sensibilidade. Sugere-se que isso se deva ao fato de que esses isolados clínicos podem apresentar uma combinação de mecanismos de resistência como ESBL, hiperprodução de AmpC ou impermeabilidade da membrana

podendo assim ainda responder ao tratamento com carbapenêmicos. Entretanto, as enzimas carbapenemases produzidas pelas enterobactérias descartam o uso de β -lactâmicos, limitando as opções de tratamento dos pacientes (SEAH et al., 2011).

No presente estudo, foi detectada a presença concomitante de metalo- β -lactamase IMP e carbapenemase KPC em quatro isolados de *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*.

As carbapenemases como KPC e IMP são enzimas de importância clínica que estão localizadas em elementos genéticos móveis (plasmídeos) e são frequentemente isoladas a partir de pacientes acometidos por infecções que tem falha terapêutica (RAMANA et al., 2013). Devido ao fato dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{IMP}* estarem associados a plasmídeos, a transmissão horizontal destes genes contribui para a disseminação de estirpes resistentes. As cepas que contém esses genes normalmente são resistentes a várias classes de antimicrobianos, restando poucas opções terapêuticas (MOSCA et al., 2013).

Levando em consideração a presença concomitante de vários tipos de β -lactamases em enterobactérias resistentes, torna-se mais difícil a identificação dos mecanismos individuais de resistência, podendo um encobrir o outro, fazendo-se necessária a pesquisa de outros genes e de outros mecanismos de resistência. A detecção fenotípica de mecanismos combinados de resistência, como a expressão de ESBL em KPC ou em metalo- β -lactamases são importantes para fins epidemiológicos, bem como para a implementação de controle de infecção (BIRGY et al., 2012).

7 CONCLUSÃO

A partir dos objetivos e resultados apresentados nesta dissertação, pode-se concluir que:

- As espécies de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos com maior prevalência foram *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*. Os sítios de isolamento mais frequentes no período do estudo, foram trato respiratório, fezes e urina.
- O método de disco difusão, utilizando discos de ertapenem, mostrou-se mais sensível do que o meropenem na triagem das amostras resistentes, as quais foram confirmadas através da técnica de PCR.
- O MHT mostrou-se pouco eficiente na identificação de cepas produtoras de carbapenemases.
- A pesquisa de genes – por meio de PCR - demonstrou ser o método mais específico na identificação das enzimas carbapenemases. A PCR simples ou a PCR multiplex foram eficazes na identificação de dois diferentes genes em nossa região (*bla_{KPC}* e *bla_{IMP}*).
- Todas as carbapenemases encontradas pelos métodos moleculares foram também acusadas por um dos métodos fenotípicos como o ensaio de disco difusão e o MHT. Somente uma técnica de triagem não é suficiente para determinação da produção de carbapenemases por enterobactérias, fazendo-se necessária a implementação de mais de uma técnica para a confirmação destas enzimas de resistência.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A alta prevalência de enterobactérias resistentes causa elevados índices de infecções relacionadas a assistência a saúde, tornando-se motivo de preocupação na comunidade científica. Deste modo, a elucidação dos mecanismos de resistência envolvendo esses microrganismos é de extrema relevância, uma vez que isto irá proporcionar o melhor desfecho clínico do paciente e poderá impedir a disseminação de resistência.

A presente dissertação concentrou-se em identificar os genes de resistência existentes nas enterobactérias relatadas em nossa comunidade. Da mesma forma, foi possível avaliar a eficácia dos métodos empregados na identificação destes isolados de enterobactérias. Comprovou-se, assim, que faz-se necessário o uso conjunto das técnicas disponíveis na detecção das enterobactérias resistentes.

Entretanto, ainda que os objetivos deste trabalho tenham sido alcançados, muitas questões não ficaram bem esclarecidas e outras surgiram. Este trabalho proporcionou apenas um entendimento preliminar sobre a resistência de enterobactérias e seus métodos de detecção, tornando-se, desta forma, imprescindível que estudos complementares sejam realizados, visando a uma melhor compreensão sobre os mecanismos de resistência a antimicrobianos encontrados nestes microrganismos.

Assim sugere-se, a curto e a longo prazo:

- Incorporar um maior número de amostras ao trabalho, para podermos melhor elucidar alguns fatos ocorridos no trabalho;
- Expandir o estudo pesquisando outros genes de resistência ou mecanismos envolvidos, como perda de porinas, bombas de efluxo e outros genes que codificam carbapenemases;
- Testar outros métodos fenotípicos, como a emprego de discos com diferentes antibacterianos;

- Realizar a tipagem por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e/ou *multilocus sequence typing* (MLST) das amostras que apresentarem algum tipo de resistência;
- Elucidar e estudar, de forma mais aprofundada, a transmissão horizontal de genes de resistência entre as enterobactérias;
- Relacionar dados clínicos dos pacientes com os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. P., BEAHR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**. v. 57, n. 3, p. 213-218, 2013.

ANDERSON, K. F. et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of microbiology**. v. 45, n. 8, p. 2723–2725, 2007.

BIRGY, A. et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 1295–1302, 2012.

BRADFORD, P. A. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases** v.39, p.55–60, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, NOTA TÉCNICA Nº 01/2013 Medidas de prevenção e controle de infecção por enterobactérias multiresistente, 2013.

BUSH, K., et al. Detection systems for carbapenemase gene identification should include the SME serine carbapenemase. **International Journal Antimicrobial Agents**. v. 41, p. 1–4. 2013.

BUSH, K , JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β - Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.3, p.969–976, 2009.

CARVALHO-ASSEF, A. P.D. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother** p 2956, 2013.

CHEN, H. et al. Epidemiology and resistance mechanisms to imipenemin *Klebsiella pneumoniae*: A multicenter study. **Molecular medicine reports**. v. 7, p. 21-25, 2013

CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute M-100, S-23, 2013

CURY, A. P. et al. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **CLINICS**. v. 67, n. 12, p.1427-1431, 2012.

DOYLE, D. et al. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 12, p.3877–3880, 2012.

DUARTE, A., F. et al. Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. **Antimicrobial agents chemotherapy**. v. 47, n. 4, p.1481–1482, 2003.

DUIN, D. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p.115–120, 2013.

GAZIN, M. et al. Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 50, n. 4, p. 1140–1146, 2012.

GIJÓN, D. et al. Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and nonhospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 5, p. 1558–1563, 2012.

HAMPRECHT, A. et al. Detection of the carbapenemase GIM-1 in *Enterobacter cloacae* in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 68, p. 558–61, 2013.

HUSSEIN, K. et al. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 7, p. 666-671, 2009.

IYOBE, S., et al. Amino Acid Substitutions in a Variant of IMP-1 Metallo- β -Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n., 8, p 2023-2027, 2000

KRUSE, E. B. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* : laboratory detection and infection control practices. **Curr Infect Dis Rep**. v. 15, p. 549–558, 2013.

LEÃO, R. S. et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-

infection in a catheter-related infection. **Clin Microbiol Infect.** V.17, p. 380–382, 2010.

LI, H. et al. Molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in China from 2008 to 2011: Predominance of KPC-2 enzyme. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.78, p. 63–65, 2014.

LIVERMORE, D. M. et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, p.1569–77, 2012.

LITTLE, M. L. et al. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric *Enterobacteriaceae*. **Int J Antimicrob Agents**.v.39, n.1, p. 52-57, 2012.

LOMAESTRO B. M. et al.; The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – producing *K. pneumoniae* to upstate New York. **Clinical Infectious Disease**. v. 43, p. 26-28, 2006.

LUPO, A. et al. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.77, p. 179–194, 2013.

MACGOWAN, A., MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance, **Prevention and Control of Infection**, v. 41, n. 11, p. 642-648, 2013.

MARCHIARO, P. et al. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.62, p.336–344, 2008.

MARKOULATOS, P. et al. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 16, p.47–51, 2002.

MENDES R. E. et al. Rapid detection and identification of metallo- β -Lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. **Journal of clinical microbiology**. v. 45, n. 2, p. 544-547, 2007.

MOSCA, A. Rapid and sensitive detection of *bla*_{KPC} gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. **Springer Plus**. v.31, n. 2, p. 2-5, 2013.

MUNOZ-PRICE, L.S., QUINNE J. P. Deconstructing the infection control bundles for the containment of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Curr Opin Infect Dis**.

v. 26, n. 4, p. 378–387, 2013.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. **Médecine et maladies infectieuses**. p. 1-6, 2013.

NORDMANN, P. e CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action!. **Clinical Microbiology and Infection** v.18, n.5, p. 411-412, 2012.

NORDMANN P. e POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes **Clinical Microbiology and Infection**. v. 8, n. 6, p. 321-331, 2002

NORDMANN et al. How To Detect NDM-1 Producers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 2, p. 718–721, 2011

NORDMANN et al. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**. v. 9, p. 228-236, 2009.

PASTERAN, F. et al Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. **Journal of clinical microbiology**. v. 47, n. 6, p. 1631–1639, 2009

PAVEZ, M. et al. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PATEL, J. B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 31, v. 8, p. 55-62 2009.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing b-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 63, p. 265–268, 2009.

POIREL, L., NORDMANN P. Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 3, p. 117-127, 2002.

POIREL, L. et al.; Integron encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. V. 4 n. 8, p.3593–3597, 2005.

POIREL, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V. 70, p. 119-123, 2011.

POTTUMARTHY, S. E. et al. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, n 8, 2003.

QUEENAN, A.M. et al. SME-3, a Novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing β -actamases. **Antimicrobial agents e chemotherapy**. v. 50, n. 10, p. 3485–3487, 2006.

QUEENAN, A. M., BUSH K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology**. v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RADICE, M. et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. **Antimicrobial. Agents Chemotherapy**. v 48, n .3, p. 1068–1069, 2004.

RAMANA, K. V. et al. Modified Hodge test: a useful and the low cost phenotypic method for detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* members. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**. V. 4, p 346-348, 2013.

RAMUSSEN J. W. E HØIBY. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 373–383, 2006

RASHEED, J. K. et al. New Delhi Metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **United States Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, 2013.

RICCIO, M. L. et al. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{MP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrobial. Agents Chemotherapy**. v. 44, n. 5, p. 1229–1235, 2000.

RIEDEL, S, CAROLL, K. C. Blood cultures: key elements for best practices and future **Directions**. **Journal Infectious Chemother**. v. 16, p. 301-316, 2010

ROOLINS, D. M., JOSEPH, S.W. In: *Enterobacteriaceae*, 2000. Disponível em <http://medic.med.utm.tmc.edu>. Acesso em fevereiro de 2014.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**. v. 52, n. 9, p.1138–1143, 2011.

RYOO, N. H. et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 698–702, 2005.

SAVARD, P. et al. The Challenges of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and Infection Prevention: Protecting Patients in the Chaos. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 34, n. 7, p. 730-737, 2013

SEAH, C. et al. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 5, p.1965–1969, 2011.

SHANMUGAM, P. et al. *Bla_{KPC}* gene detection in clinical Isolates of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 7, n. 12, p. 2736-2738, 2013.

SHOMA, S. et al. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying *bla_{NDM-1}*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.78,p.93–97, 2013.

TSAKRIS, A. et al. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**. v. 49, n.8, p. 2804–2809, 2011.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, n. 4, p. 682–707, 2012.

XIA, Y. et al. Characterization of carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae* species exhibiting decreased susceptibility to carbapenems in a university hospital in chongqing, China. **Ann Lab Med**. v. 32, p.270-275, 2012.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a

carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents e Chemotherapy**. v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

WANG, L. et al. A rapid low-cost real-time PCR for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.11, n. 9, p. 1-6, 2012.

WALSH, T. R. The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical Microbiology and Infection**. v.11, p. 2-9, 2005.

WALSH, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International of Journal Antimicrobial Agents**. v.36, p. S8-S14, 2010.

WOODFORD, N., e JOHNSON A.P. Molecular Bacteriology and Clinical Application. **Humana Press**. 1. edição. New Jersey :Totowa, 1998, p. 17–33.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Quadro de resultados fenotípicos e genotípicos.

N^a	BACTERIA	AMOSTRA CLÍNICA	HODGE	KPC	NDM	IMP	VIM	SPM	GIM	OXA-48
1	Klebsiella oxytoca	urina	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG
2	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	sangue	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	Klebsiella oxytoca	sangue	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
4	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	ponta de cateter	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
5	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	urina	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
6	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	urina	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
7	Klebsiella oxytoca	secrecao traquial	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG
8	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	secrecao traqueal	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
9	Klebsiella oxytoca	secrecao traqueal	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG
10	Enterobacter cloacae complex	liq cavidade abdominal	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
11	Klebsiella oxytoca	escarro	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
12	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	fezes	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
13	Escherichia coli	secrecao traqueal	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
14	Escherichia coli	secreção traquial	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
15	Enterobacter cloacae complex	secrecao traqueal	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
16	Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae	ulcera	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
17	Klebsiella pneumoniae ssp	liquido peritonial	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG

APÊNDICE B – Quadro do perfil de suscetibilidade das amostras.

Nº	AMP	AMP+ SULB	AMOX + AC	AMIC	AN	CEFU	CEFU ACETIL	CEFA	CEFT	CEFE	CIPRO	COLIS	ERT	GEN	IMI	MER	NOR	NITRO	PIPE+ TAZO	TRIM+ SULF	TIG	CEFT
1	R		R	S	S	R	R	R	S	S	S		R	S		R	S	S	R	S		
4	R	R		S		R	R		S	S	S	S	R	S	R	R			R		S	S
5	R	R		S		R	R		S	S	S	S	R	S	R	R			R		S	I
6	R	R		S		R	R		S	S	S	S	R	S	R	R			R		S	I
7	R		R	S	R	R	R	R	R	R	R		R	R		S	R	R	R	R		
8	R		R	S	R	R	R	R	R	R	R		R	R	S	R	R	R	R	R		
9	R	R		S		R	R		R	S	S	S	R	S	R	R			R		S	I
10	I	S		S		R	R		S	S	S	S	S	S	R	R			R		S	S
11	R	R		S		R	R		I	I	S	S	R	S	R	R			R		S	R
12	R	R		S		R	R		R	R	R	S	R	R	S	S			R		R	R
13	R	R		S		R	R		S	S	S	S	R	S	R	R			R		S	I
14	R		R	S	R	R	R	R	R	R	I		R	S		R	I	R	R	S		
15	R	R		S		R	R		S	S	R	S	S	S	R	R			R		S	I
16	R	R		S		R	R		R	I	S	S	S	S	I	S			R		S	R
17	R	R		S		R	R		R	R	S	S	R	S	S	S			R		S	R
18	R	R		S		R	R		R	R	R	R	R	R	R	R			R		I	R
19	R	R		S		R	R		S	S	S	S	R	S	R	R			R		S	I
21	R	R		S					R		R	S		R					R		I	

22	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R		R	R	R	R	R		
23	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R		R	S		R	R	R	R	S		
24	R	R		S		R	R		I	I	S	S	R	S	R	R			R		S	I
25	R	R		S	R	R	R		R	R	R	S	R	R	R	R			R		S	R
26	R			R		R	R		R	R	R	S	R	R	R	R			R		I	R
27	R	R		S		R	R		R	R	R	R	R	R	R	R			R		R	R
28	R	R		S		R	R		R	R	R	S	R	R	R	R			R		R	R
29	R	R		S		R	R		R	R	R	S	R	R	R	R			R		R	I
30	R	R		S		R	R		S	I	R	S	R	S	R	R			R		R	I
31	R	R		S		R	R		R	S	S	S	R	S	S	S			R		S	R
32	R	R		S		R	R		R	S	S	S	R	S	S	S			R		S	R
33	R	R		S		R	R		S	I	S	S	R	S	R	R			R		S	I
35	R	R		S	R	R	R	R	R	R	R		R	R		R	R	R	R	R		
36	R	R		S		S	R		S	S	S	S	S	S	I	S			S		S	S
37	R	R		S					R	R	R	S	R	R	R	R			R		S	R
38	R	R		S		R	R		R	R	R	R	R	I	R	R			R		I	R

AMP: Ampicilina

AMOX+ SULB: Amoxicilina + Sulbactam

AMOX + AC: Amoxicilina + Ácido Clavilânico

AMIC: Amicacina

NA: Ácido Nalidíxico

CEFU: Cefuroxima

CEFU + ACETIL: Cefuroxima + Acetil

CEFA: Cafalotina

CEFT: Ceftriaxona

CEFE: Cefepime

CIPRO: Ciprofloxacino

COLIS: Colistina

ERT: Ertapenem

GEN: Gentamicina

IMI: Imipenem

MER: Meropenem

NOR: Norfloxacino

NITRO: Nitrofurantoína

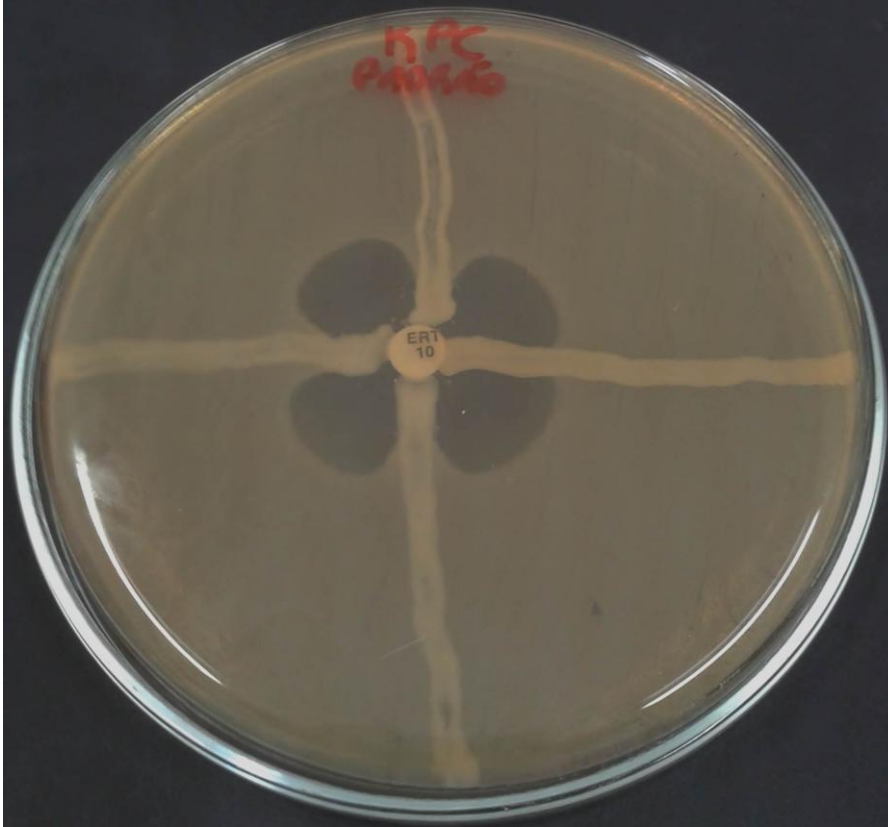
PIPE + TAZO: Piperaciclina + Tazobactan

TRIM + SULFA: Trimetropim + Sulfametoxazol

TIG: Tigeclicina

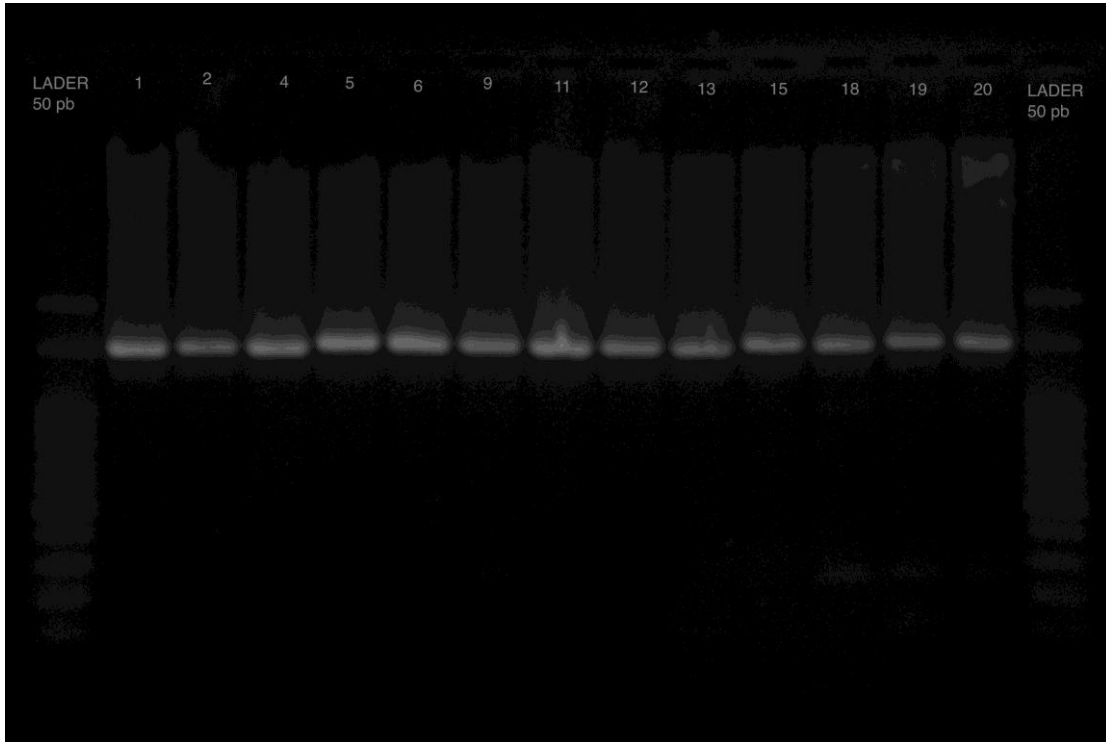
CFTA: Ceftazidima

APÊNDICE C–Foto teste modificado de Hodge.

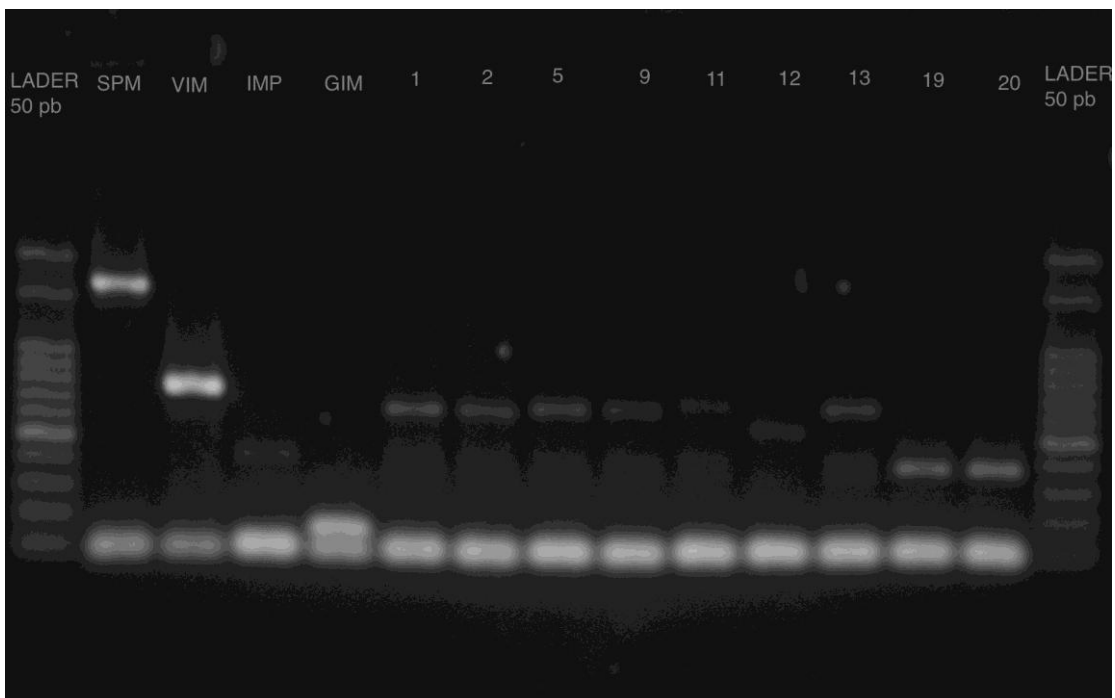


APÊNDICE D – Fotos dos géis de eletroforese.

Amostras positivas para o gene *bla*_{KPC}.

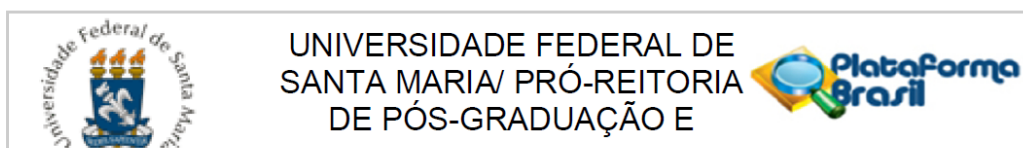


Amostras positivas para os genes *bla*_{IMP}.



ANEXOS

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFSM.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Pesquisador: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27094514.7.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 570.476

Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado, que descreve a emergência de resistência bacteriana aos carbapenêmicos. As enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos têm sido notáveis devido a capacidade de causar surtos e pelo aumento de sua prevalência. As carbapenemases mais frequentemente encontradas são as KPC, em sua maioria codificadas por plasmídios em cepas de *K. pneumoniae*. No Brasil, existem diversos relatos de casos e surtos envolvendo cepas produtoras de KPC, predominantemente em isolados de *K. pneumoniae*. No período de junho a dezembro de 2013, foram identificados 34 casos de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), sendo 58% destes causados por *Klebsiella pneumoniae*. Portanto, *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos representa hoje um problema importante na instituição. **MÉTODO:** O presente projeto, propõe-se a realização de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo e caracterização molecular de aproximadamente 200 isolados clínicos de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Estas amostras serão selecionadas durante 12 meses consecutivos, sendo estudados todos os isolados bacterianos de enterobactérias resistentes ao ertapenem, com teste de Hodge modificado (HTM) positivo ou inconclusivo, provenientes de qualquer sítio de infecção. Inicialmente, as cepas isoladas serão identificadas pelo sistema Vitek2 e submetidas ao HTM e

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

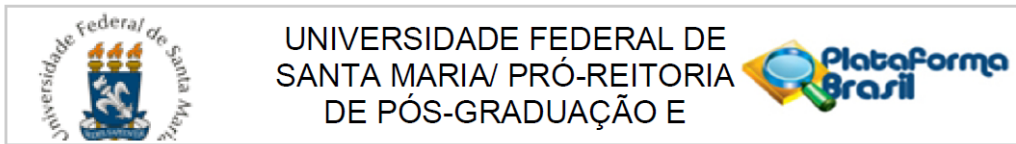
CEP: 91.059-900

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 570.476

teste de sensibilidade por E-test para confirmação da resistência, como rotina, no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do HUSM. Os isolados serão submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Serão testados os seguintes antimicrobianos: imipenem/cilastatina sódica, meropenem, ertapenem, sulfato de polimixina B e tigeciclina. Todos isolados clínicos identificados fenotipicamente como resistentes a imipenem, meropenem e ertapenem, serão confirmados por PCR quanto à presença de genes que codificam enzimas com capacidade de hidrólise de carbapenêmicos, a saber: KPC, GES, IMP, VIM, GIM-1, SIM-1 e SPM. Para investigar a presença destes genes será realizada PCR com iniciadores específicos para cada gene. A análise dos dados será realizada através da colocação dos resultados em um banco de dados, que será gerado utilizando-se o programa Bionumerics (AppliedMaths, Bélgica). Esse programa possui diversos módulos que permitem analisar os resultados de sensibilidade a antimicrobianos, caracterização e tipagem molecular.

Objetivo da Pesquisa:

GERAL: Caracterizar molecularmente isolados clínicos da família das Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria.

ESPECÍFICOS:

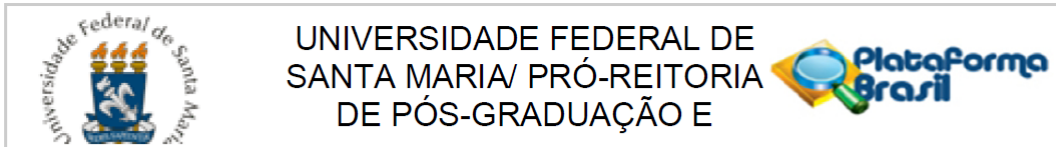
- 1- Por meio da detecção de genes que codificam carbapenemases, determinar se o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é por produção de enzimas que degradam essas drogas;
- 2- Identificar diferentes tipos de carbapenemases através de técnicas moleculares;
- 3- Avaliar perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: a pesquisa não trará risco de ordem física ou psicológica aos pacientes que apresentarem infecção pelos isolados clínicos estudados, pois os testes in vitro serão realizados com material já coletado e processado, não havendo intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente, não sendo estes envolvidos diretamente na pesquisa.

BENEFÍCIOS: Não haverá benefícios diretos ao paciente. Apenas benefícios indiretos, com maior conhecimento do tema estudado.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 91.059-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 570.476

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta Termo de confidencialidade, folha de rosto, autorização institucional, registro no GAP devidamente redigidos e assinados.

Recomendações:

.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências assinaladas anteriormente foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 26 de Março de 2014

Assinador por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
 (Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 91.059-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com