

# Análise dos mecanismos de resistência relacionados às enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas em um hospital de referência em doenças infecto-contagiosas

**Analysis of resistance mechanisms related to enterobacteria with decreased susceptibility to carbapenems isolated from a referral hospital in infectious diseases**

Vanessa Caroline Randi Magalhães<sup>1</sup>

Valéria Martins Soares<sup>2</sup>

## Resumo

**Objetivo:** Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de carbapenemases tem o impacto mais significativo na saúde humana. Esse trabalho tem como objetivo analisar os mecanismos de resistência relacionados às enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas no Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Brasil. **Métodos:** Trata-se de um estudo retrospectivo das cepas de enterobactérias onde houve a detecção fenotípica de provável produção de carbapenemases e análise molecular. **Resultados:** Esse estudo mostrou que a principal carbapenemase encontrada entre os isolados foi a KPC, no entanto chama a atenção o isolamento de uma cepa produtora de NDM. **Conclusão:** A detecção de carbapenemases codificadas em elementos móveis reforça a necessidade de uma vigilância epidemiológica constante na instituição.

## Palavras-chave

Carbapenêmicos; Enterobacteriaceae; Resistência

## INTRODUÇÃO

A ausência de novos antibióticos contra as bactérias Gram-negativas e o surgimento de mecanismos de resistência que eliminam as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das doenças infecciosas causadas por enterobactérias são as causas de um grave problema de saúde pública no âmbito mundial.<sup>(1)</sup> Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de carbapenemases, seja por sua eficiência hidrolítica, pela codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis ou pela sua rápida disseminação, tem o impacto mais significativo na saúde humana.<sup>(2,3)</sup>

As carbapenemases são  $\beta$ -lactamases que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e, em vários graus, carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem).<sup>(4)</sup> Três grandes classes de carbapenemases são encontradas atualmente em enterobactérias no mundo

inteiro: as metalo- $\beta$ -lactamases, incluindo as NDM (*New Delhi metallo- $\beta$ -lactamases*); as OXA-carbapenemases, sendo a OXA-48 a mais frequente em enterobactérias; e as carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase).<sup>(3)</sup>

As OXA-carbapenemases foram inicialmente identificadas em isolado de *Klebsiella pneumoniae* na Turquia em 2001.<sup>(5)</sup> Até o momento estão menos globalmente disseminadas, com circulação mais restrita ao Oriente Médio e alguns países europeus.<sup>(2,5)</sup> O primeiro relato de KPC ocorreu na Carolina do Norte, nos Estados Unidos, em 1996. Hoje é endêmica nesse país e segue com crescentes casos nos últimos anos em todo o mundo. No Brasil, já foram reportados isolados em diversos gêneros e espécies bacterianas, o que evidencia a sua disseminação no país.<sup>(6,7)</sup> Em 2008, no norte da Europa, a carbapenemase NDM-1 foi detectada em *Klebsiella pneumoniae*, isolada de uma paciente de origem indiana com infecção urinária.<sup>(3,5)</sup> O conti-

<sup>1</sup>Microbiologista. Superior em Farmácia e Bioquímica / Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte-MG, Brasil.

<sup>2</sup>Setor de Microbiologia do Laboratório do Hospital Júlia Kubitschek da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) – Belo Horizonte-MG, Brasil.

Instituição: Hospital Eduardo de Menezes - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) – Belo Horizonte-MG, Brasil.

Conflito de interesses: Não há conflito de interesses

Recebido em 28/12/2017

Artigo aprovado em 06/11/2018

DOI: 10.21877/2448-3877.201800661

nente indiano possui altas taxas de prevalência desta enzima. Os relatos de isolamento de NDM no Brasil são escassos, porém já foi reportada a detecção dessa carbapenemase em *Providencia rettgeri*, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul,<sup>(8)</sup> além de cepas de *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae* produtoras de NDM em quatro diferentes hospitais localizados em duas cidades do estado do Rio de Janeiro.<sup>(9)</sup>

A redução da sensibilidade aos carbapenêmicos nas enterobactérias pode, no entanto, também ser causada por  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) ou enzimas AmpC, quando coexiste diminuição da permeabilidade devido à alteração ou redução da expressão de porinas.<sup>(10)</sup>

Neste contexto, considerando a relevância e os desafios impostos pelo tema, objetivou-se a análise dos mecanismos de resistência relacionados às enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas de pacientes hospitalizados no Hospital Eduardo de Menezes (HEM) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), um hospital de referência para AIDS e outras doenças infecto-contagiosas, localizado em Belo Horizonte no estado de Minas Gerais, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo e retrospectivo no qual foram incluídas todas as cepas de enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos, isoladas de amostras clínicas no setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HEM, no período de janeiro de 2015 a julho de 2017.

Os métodos manuais utilizados foram o método semi-quantitativo de difusão em disco, também conhecido como método Kirby & Bauer, e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio de fitas de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia).

A detecção fenotípica de carbapenemases foi realizada de acordo com o documento anual do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)(11) e a Nota Técnica N°01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).<sup>(3)</sup> O teste de sensibilidade para as enterobactérias isoladas de pacientes nosocomiais foi realizado testando-se simultaneamente os discos dos antibióticos ertapenem, imipenem e meropenem. Para bactérias do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) foram considerados apenas os resultados de imipenem e meropenem. Caso o isolado fosse sensível aos três carbapenêmicos, o resultado era liberado como tal, não sendo necessário pesquisar os genes de resistências às carbapenemases.

Os critérios interpretativos de susceptibilidade a estes carbapenêmicos utilizados para as enterobactérias são: diâmetro de halo de inibição  $\leq 22$ mm ou concentração

inibitória mínima (CIM)  $\geq 2\mu\text{g/mL}$  para o imipenem e o meropenem e diâmetro do halo de inibição  $\leq 24$  mm, ou CIM  $\geq 1\mu\text{g/mL}$  para o ertapenem. Os isolados bacterianos que apresentaram um dos critérios acima citados foram encaminhados para o laboratório de referência da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) para a realização de PCR multiplex (Reação da Cadeia da Polimerase) para pesquisa dos genes que codificam as carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-48.

A coleta de dados foi realizada a partir dos registros internos do setor de Microbiologia para as seguintes variáveis: gênero e espécie da bactéria isolada, amostra clínica, perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos e aminoglicosídeos e resultado do teste molecular. Os dados coletados foram analisados utilizando-se o programa de domínio público EpilnfoTM criado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*).<sup>(12)</sup>

### Considerações éticas

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, parecer técnico número 72363617.1.0000.5124 (CAAE).

## RESULTADOS

No período do estudo, foram isoladas 48 cepas com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos, sendo que 38/48 (79,2%) eram produtoras de KPC, através de confirmação molecular, e 9/48 (18,7%) foram negativas para KPC, OXA e NDM. Nesse período, houve o isolamento de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo NDM.

A Tabela 1 apresenta a prevalência das diferentes espécies de enterobactérias na amostra e a positividade para KPC e NDM.

Tabela 1 - Prevalência das espécies de enterobactérias nas amostras clínicas e positividade para KPC e NDM

Microrganismo	Isolados, n(%)	Positividade para carbapenemases, n (%)		
		KPC	NDM	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40(83,3%)	32(80%)	01(2,5%)	07(17,5%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	03(6,2%)	03(100%)	00	00
<i>Enterobacter cloacae</i>	03(6,2%)	02(66,7%)	00	01(33,3%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01(2,1%)	01(100%)	00	00
<i>Morganella morganii</i>	01(2,1%)	00	00	01(100%)

Com relação ao sítio de isolamento, a maioria dessas 48 cepas foi isolada em amostras de urina (47,9%), seguidas pelo sangue (25%), aspirado traqueal (10%) e outras.

## DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos é um desafio crescente à saúde humana no mundo. Esse estudo mostrou que a principal carbapenemase encontrada entre os isolados foi a KPC, confirmando a disseminação endêmica dessa enzima no Brasil e em outros países, sendo a carbapenemase mais frequentemente observada desde a sua descrição inicial em 1999.<sup>(12)</sup> No entanto, esse trabalho chama a atenção pelo isolamento de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de NDM. Não foram encontradas carbapenemases do tipo OXA-48.

O microrganismo predominante foi a *Klebsiella pneumoniae*, correspondendo a 83,3% dos isolados com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos. Apesar do papel de destaque da *Klebsiella pneumoniae*, com sua predisposição a causar infecções nosocomiais e a habilidade de acumular e transferir mecanismos de resistência, a disseminação para outras espécies é frequente e esse trabalho mostra o isolamento de KPC entre *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* na instituição. A transferência lateral de genes para KPC entre enterobactérias colonizantes do intestino é frequente.<sup>(13)</sup>

Após a sua descrição inicial, a metalo- $\beta$ -lactamase NDM ganhou atenção pública devido à sua rápida disseminação mundial. Apesar de os relatos de isolados clínicos produtores de NDM serem escassos no Brasil, acredita-se que o isolamento dessas se tornem mais frequentes após a implementação da padronização das técnicas pela Anvisa.<sup>(3)</sup> Em nossa instituição, devido ao fácil acesso e à rapidez da liberação das técnicas moleculares pelo laboratório de referência (FUNED), optou-se pela triagem utilizando-se os halos de inibição por metodologia de disco-difusão e concentração inibitória mínima (CIM), não sendo utilizados os testes com inibidores e potenciadores para a detecção de carbapenemases (EDTA e ácido borônico).

O relato do primeiro isolamento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo NDM na instituição sinaliza a necessidade de que a vigilância da emergência de novos mecanismos de resistência seja constante e eficaz dentro das instituições de saúde, apontando uma oportunidade para controle da disseminação desse tipo de resistência no Brasil.<sup>(3)</sup> Atenção especial é requerida quando são tratados pacientes com história recente de hospitalização em outros locais, principalmente em países onde há prevalência de bactérias produtoras dessas enzimas.<sup>(13)</sup> O movimento internacional de pacientes entre os países resultou na detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM em diversos locais, inclusive no Brasil, no estado do Rio de Janeiro. Além disso, há relatos de pacientes que apenas viajaram a países como Índia, Paquistão e Bangladesh, o que pode indicar a aquisição comunitária de cepas produtoras de NDM pela ingestão de água ou ali-

mento contaminado.<sup>(9)</sup> A coexistência de NDM e outras carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae* também já foi reportada em vários países e no Brasil, onde os autores mostraram a coprodução de duas importantes enzimas, KPC-2 e NDM-1.<sup>(14)</sup>

Em 09/48 (18,7%) não foi encontrada nenhuma carbapenemase. A redução da sensibilidade aos carbapenêmicos nas enterobactérias pode também ser causada por  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) ou enzimas AmpC, quando coexiste diminuição da permeabilidade devido à alteração ou redução da expressão de porinas.<sup>(15)</sup>

As cepas analisadas foram isoladas principalmente em amostras de urina, seguida pelas amostras de sangue. Estudos mostram que a mortalidade de pacientes com infecções de corrente sanguínea por essas bactérias produtoras de carbapenemases é muito alta, principalmente em pacientes de unidades de terapia intensiva.<sup>(13)</sup>

As opções terapêuticas para essas cepas são limitadas, restando poucos antimicrobianos, como a colistina, aminoglicosídeos e tigeciclina. Observou-se que 16/48 (33,3%) e 10/48 (22,7%) das cepas ainda guardavam sensibilidade a amicacina e gentamicina, respectivamente. Outras 16/48 (33,3%) e 2/48 (4,5%) apresentaram sensibilidade intermediária a esses mesmos antimicrobianos. O perfil de sensibilidade a tigeciclina não foi avaliado, bem como para a polimixina, pois para a última droga a metodologia de disco-difusão e gradiente em ágar não são confiáveis para essa finalidade.

O presente estudo possui algumas limitações. Uma delas foi a ausência de coleta de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes para verificar possíveis fatores de risco associados à produção de carbapenemases. Por tratar-se de um estudo retrospectivo, não foi possível estudar a história clínica do paciente onde foi isolada a carbapenemase do tipo NDM para verificar se houve viagem e internação em outros países. Ressalta-se que o Hospital Eduardo de Menezes é um hospital público de referência estadual em doenças infecto-contagiosas, recebendo muitas vezes pessoas de outros locais, principalmente quando há grandes eventos na cidade. Além disso, não foram incluídos isolados obtidos a partir de swabs retais para cultura de vigilância, pois o laboratório de referência, Fundação Ezequiel Dias (Funed), não analisa esse tipo de amostra proveniente de locais onde já houve confirmação anterior da detecção de KPC.

## CONCLUSÃO

Nos últimos anos, enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos têm sido cada vez mais reportadas em todo o mundo. Em particular, *Klebsiella pneumoniae* tem adquirido carbapenemases, reduzindo as opções de tratamento para infecções bacterianas. Esse estudo mostrou

a detecção de dois tipos de carbapenemases de grande importância epidemiológica associadas a elementos genéticos móveis na instituição, reforçando a necessidade e a importância de uma vigilância constante para prevenir a disseminação dessas enzimas no ambiente hospitalar.

### Agradecimentos

Incentivo Fapemig, por meio de bolsa no Programa de Capacitação de Recursos Humanos (PCRH).

### Abstract

**Objective:** Among the mechanisms of resistance to carbapenems, the production of carbapenemases has the most significant impact on human health. This work aims to analyze resistance mechanisms related to enterobacteria with decreased susceptibility to carbapenems isolated at the Eduardo de Menezes Hospital of the Hospital Foundation of the State of Minas Gerais (FHEMIG), Brazil. **Methods:** This is a retrospective study of enterobacterial strains where there was phenotypic detection of probable production of carbapenemases and molecular analysis. **Results:** This study showed that the main carbapenemase found among the isolates was KPC, however, the isolation of an NDM-producing strain is noteworthy. **Conclusion:** The detection of carbapenemases encoded in mobile elements reinforces the need for constant epidemiological surveillance in the institution.

### Keywords

Carbapenems; Enterobacteriaceae; Resistance

## REFERÊNCIAS

1. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1019-25.
2. Pinto FM, Sima SDM, Baldin CP, Limberger II, da Silva RCF, Antichevis LC, et al. Prevalência de Carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. *Clin Biomed Res.* 2014;34(1): 47-52.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Nota Técnica nº1/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília: 2013.
4. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58.
5. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J. Epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii in Mediterranean countries. *Biomed Res Int.* 2014;2014:305784.
6. Soares VM. Emergência de Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. [Internet]. 2012; 48(4):251-253. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442012000400003&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442012000400003&lng=en).
7. Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing Pseudomonas aeruginosa in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4990.
8. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(12): 2956-57.
9. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(2):174-77.
10. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant Klebsiella and Enterobacter spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):659-67.
11. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Table: M100 - S25; 950 West Valley Road Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA, 2015.
12. Center of Disease Control Prevention (CDC). Epi-info program version 7.2.1.0 of January 2017. Atlanta. 2004. Disponível em: <https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>. Acesso em outubro de 2017.
13. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Genetic Context, Treatment options, and detection methods. *Front. Microbiol.* 2016;7:895.
14. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, Marques EA, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in Enterobacter hormaechei from Brazil. *Microb Drug Resist.* 2015;21(2):234-36.
15. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. BrCAST: 2013. Versão 1.0.

Correspondência

**Vanessa Caroline Randi Magalhães**

Hospital Eduardo de Menezes

Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

Rua Doutor Cristiano Resende, 2213, Bairro Bom Sucesso

30622-020 – Belo Horizonte - MG, Brasil