

# Emergência de Enterobacterales produtoras de metalo-beta-lactamases em um Hospital de Referência para Covid-19

## *Emergency of Enterobacterales producing metallo-beta-lactamases in a referral hospital for Covid-19*

Valéria Martins Soares<sup>1</sup>, Diana Manzi Viegas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital Júlia Kubitschek – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Resumo

A resistência aos antimicrobianos é uma crescente ameaça à saúde pública mundial. O objetivo desse estudo foi reportar a emergência de Enterobacterales produtoras de metalo-beta-lactamases no Hospital Júlia Kubitschek (HJK), direcionado para o atendimento aos pacientes de Covid-19. Trata-se de um estudo descritivo de caráter retrospectivo. Foram incluídas 128 cepas de Enterobacterales produtoras de carbapenemases isoladas entre janeiro de 2021 a setembro de 2021. Entre as 128 bactérias com detecção de carbapenemases, 92/128 eram do tipo serino, 32/128 eram NDM e em 1/128 foram detectados os genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>. Além disso, o teste fenotípico mCIM eCIM mostrou-se uma boa ferramenta na triagem da produção e classificação das carbapenemases na instituição.

**Palavras-chave:** enterobacterales; metalo-beta-lactamases; Covid-19

### Abstract

Antimicrobial resistance is a growing threat to global public health. The aim of this study was to report the emergence of metallo-beta-lactamases producing Enterobacterales at Hospital Júlia Kubitschek (HJK), aimed at the care of patients with Covid-19. This is a descriptive, retrospective study. A total of 128 carbapenemase-producing Enterobacterales strains isolated between January 2021 and September 2021 were included. Among the 128 bacteria with carbapenemase detection, 92/128 were serine-type, 32/128 were NDM and 1/128 were blaKPC plus blaNDM. In addition, the mCIM eCIM phenotypic test proved to be a good tool for screening the production and classifying carbapenemases in the institution.

**Keywords:** enterobacterales; metallo-beta-lactamases; Covid-19

Correspondência

**Valéria Martins Soares**

E-mail: [valeria-msoares@hotmail.com](mailto:valeria-msoares@hotmail.com)

Recebido em 23/02/2022 | Aprovado em 19/05/2022 | DOI: 10.21877/2448-3877.202200025

## INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é uma crescente ameaça à saúde pública mundial e gera muita preocupação e impactos negativos. A produção de enzimas que degradam os carbapenêmicos é o principal fator relacionado à resistência e diversas carbapenemases já foram descritas como a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e a New Delhi metalo-beta-lactamases, entre outras<sup>(1)</sup>. A resistência aos carbapenêmicos em Enterobacterales é, na maioria dos casos, mediada por plasmídios, que exercem um importante papel na disseminação do gene, necessitando de práticas de controle de infecção rigorosas.<sup>(2)</sup>

Os carbapenêmicos, um agente antimicrobiano efetivo, teve seu uso limitado devido a esse novo cenário de emergência das cepas produtoras de carbapenemases. Tanto a KPC quanto a NDM se disseminaram rapidamente a nível mundial e estão geralmente associadas a resistência a outros antimicrobianos.<sup>(3)</sup>

A primeira descrição da KPC ocorreu nos Estados Unidos, em 1996. Após o relato inicial no Brasil várias publicações tem demonstrado a disseminação em todo o país, inclusive em bacilos Gram negativos não fermentadores.<sup>(4,5)</sup> No Hospital Júlia Kubitschek da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), o primeiro isolamento de Enterobacterales produtora de KPC ocorreu no ano de 2009, tornando-se endêmica na instituição.<sup>(6)</sup>

Com relação à NDM, foi reportada pela primeira vez no mundo em 2009, em uma *Klebsiella pneumoniae* originária da Índia e isolada em 2008. No Brasil o primeiro relato ocorreu no ano de 2013, em uma cepa de *Providencia rettgeri* e desde então o gene vem sendo detectado em várias espécies e locais.<sup>(7)</sup>

A partir de 2009, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) passou a recomendar a pesquisa da enzima KPC em isolados de Enterobacterales com resistência às cefalosporinas de subclasse III e sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos e a utilização do teste de triagem que permitisse detectar a inativação do antimicrobiano. Desde então algumas modificações foram realizadas na técnica, tornando possível diferenciar as metalo-beta-lactamases de serino carbapenemases.<sup>(8)</sup>

Entre as consequências da pandemia da covid-19, com milhões de casos em todo mundo, existe uma grande preocupação com o aumento global da resistência aos antimicrobianos<sup>(9)</sup>.

O objetivo desse estudo foi reportar a emergência de Enterobacterales produtoras de metalo-beta-lactamases no Hospital Júlia Kubitschek (HJK) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), um hospital geral que foi

direcionado para o atendimento aos pacientes de covid-19, localizado em Belo Horizonte, Brasil. Além disso, foi avaliado se o método fenotípico mCIM eCIM foi eficiente na triagem da produção de carbapenemases.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo de caráter retrospectivo. Foram incluídas 128 cepas de Enterobacterales produtoras de carbapenemases isoladas entre Janeiro de 2021 a Setembro de 2021 em diversas amostras clínicas, conforme tabela 1. Isolados de amostras clínicas diferentes de um mesmo paciente foram excluídos.

No setor de microbiologia do Laboratório do HJK, a identificação das espécies é realizada por meio de testes bioquímicos tradicionais e do sistema semi-automatizado BBL Crystal® (Enteric/Nonfermenter ID System/Becton, Dickinson and Company). As Enterobacterales produtoras de carbapenemases foram triadas de acordo com o documento anual do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) do ano corrente:<sup>(8)</sup> isolados com halo de inibição por disco difusão  $\leq 22$  mm para imipenem e meropenem e  $\leq 21$  mm para ertapenem foram consideradas suspeitos.

O teste fenotípico para a detecção de carbapenemases mCIM eCIM foi realizado conforme descrito no documento do CLSI.<sup>(8)</sup> Quando o teste indicou a detecção de metalo-beta-lactamases, as cepas foram enviadas para o Laboratório de Referência da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) para realização da confirmação molecular por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para pesquisa dos genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  e  $bla_{OXA}$ . Para o teste fenotípico positivo para carbapenemases do tipo serino (KPC, OXA, dentre outras), não foi estabelecido na unidade o fluxo de encaminhar para a confirmação molecular, uma vez que, ao longo dos anos, notou-se alta concordância com o teste molecular nesses casos. Ao mesmo tempo, o laboratório de Microbiologia/HJK realizou a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por meio do E-test® para os carbapenêmicos (Biomerieux®) e a microdiluição em caldo para a polimixina (Policimac®-Probac do Brasil). As amostras resistentes a polimixina também foram enviadas para a FUNED para pesquisa do gene *mcr-1* (*mobilised colistin resistance*).

## ÉTICA

Este trabalho foi aprovado no CEP FHEMIG, CAAE 55250422.1.0000.5119.

## RESULTADOS

Durante o período do estudo foram isoladas 128 cepas produtoras de carbapenemases em diversas Enterobacterales (Tabela 2), sendo que em Janeiro houve a primeira detecção de NDM na unidade. Entre as 128 bactérias produtoras de carbapenemases, 92/128 eram do tipo serino, 32/128 eram NDM e em 1/128 foram detectados os genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>. Foram excluídas do estudo 3/128 isolados por não haver resultado molecular liberado pela FUNED devido a discrepâncias na identificação da espécie. Como nem todas as cepas classificadas como KPC pelo método fenotípico foram enviadas, o resultado pelo método molecular foi obtido em um total de 54/128 amostras.

**Tabela 1**

Amostras clínicas incluídas no estudo

Amostras clínicas	Frequência (n)	Porcentagem
Aspirado traqueal	32	25,00%
Lavado broncoalveolar	1	0,78%
Escarro	1	0,78%
Ferida sacral	1	0,78%
Fragmento de tecido	3	2,34%
Líquido pleural	1	0,78%
Ponta de cateter	18	14,06%
Sangue	15	11,72%
Swab retal	37	28,91%
Urina	19	14,84%
Total	128	100,00%

**Tabela 2**

Tipos de microrganismos e carbapenemases encontradas

Microrganismo	KPC (n)	NDM (n)	KPC + NDM (n)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	85	14	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	11	1
<i>Providencia rettgeri</i>	-	3	-
<i>Escherichia coli</i>	1	2	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	2	1	-
<i>Serratia</i> spp.	1	-	-
<i>Providencia rustigianii</i>	-	1	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	-	-

Legenda: KPC=*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; NDM = New Delhi metalo-beta-lactamases

## DISCUSSÃO

A pandemia de covid-19 criou condições que favoreceram a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos nos serviços de saúde: aumento no número e no tempo de hospitalização dos pacientes com covid-19; pacientes graves com uso prolongado de dispositivos invasivos e assistência intensiva; redução do número de profissionais de saúde e aumento da carga de trabalho; dificuldades para implementação de medidas de prevenção e controle de infecções; utilização excessiva e empírica de antimicrobianos de amplo espectro, em larga escala, para tratamento de infecções secundárias, fúngicas ou bacterianas.<sup>(9)</sup> Esse foi justamente o cenário encontrado no HJK, um hospital que foi direcionado para o atendimento a covid-19, com súbito aumento de leitos de terapia intensiva em um curto espaço de tempo.

Conforme observado por outros autores,<sup>(10)</sup> houve um aumento significativo na prevalência de bactérias produtoras de KPC quando comparado o período anterior a pandemia. Estudos internacionais indicaram que aproximadamente 70% dos pacientes hospitalizados com covid-19 receberam antibióticos, na maior parte de amplo espectro, apesar da falta de evidência de co-infecção por bactérias.<sup>(11)</sup> No HJK, foram diagnosticados 39 pacientes com Enterobacterales produtoras de KPC em 2019, principalmente em *Klebsiella pneumoniae*. No período do estudo, foram 92/128 isolados produtores de carbapenemases do tipo serino, provavelmente KPC. Em nosso hospital, antes da pandemia, apenas cepas KPC tinham sido isoladas. Em 2021 houve a emergência de NDM com a detecção em 32/128 cepas estudadas.

As New Delhi metalo-beta-lactamases (NDMs), com suas 28 variantes já descritas, são uma família de enzimas que disseminou rapidamente pelo mundo, geralmente associada à prognósticos ruins e alta mortalidade.<sup>(2)</sup> Conforme demonstrado na tabela 2, nota-se que, apesar do predomínio de *Klebsiella pneumoniae* entre os isolados KPC, para a NDM é marcante a emergência em outras espécies como *Proteus mirabilis* (12/33). A aquisição de genes de resistência nessa espécie, além de outros gêneros como *Providencia* spp. e *Serratia* spp., torna-se ainda mais preocupante, uma vez que são bactérias intrinsecamente resistentes às polimixinas, limitando ainda mais o número de antimicrobianos disponíveis para o uso clínico.<sup>(2)</sup>

Gao et al.<sup>(12)</sup> relatou a emergência de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (CRKP) e produtoras de KPC-2 e NDM-1. Ensaios de transferência de plasmídios e

análises filogenéticas sugeriram que a CRKP KPC2-NDM1 emergiu de uma CRKP progenitora que adquiriu outro plasmídeo altamente transferível portando o gene blaNDM-1. Além disso, testes de estabilidade mostraram que esses isolados eram estáveis e tinham capacidade de transmissão entre pacientes.

Esse relato é preocupante uma vez que em nosso estudo foi detectada uma cepa de *Proteus mirabilis* com teste fenotípico positivo para metalo-beta-lactamases e com a presença dos genes blaKPC e blaNDM, gerando a preocupação de uma possível disseminação na unidade e maior limitação das opções terapêuticas já tão escassas. Dados do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR) mostram Enterobacterales positivas concomitantemente para blaKPC e blaNDM em até 8% do total de isolados positivos para estes genes.<sup>(4)</sup> Gao et al.<sup>(12)</sup> mostrou, por meio de testes de sensibilidade aos antimicrobianos, que o composto ceftazidime-avibactam, recém introduzido em alguns países para tratamento de bactérias produtoras de KPC, tinham pouco efeito nas cepas que continham os dois genes para KPC e NDM.

A criticidade desse cenário de resistência é agravada pela elevada taxa de resistência a outros antimicrobianos. Geralmente os genes que codificam as carbapenemases estão localizados em plasmídios, que também carregam outros genes de resistência para os aminoglicosídeos e quinolonas.<sup>(2)</sup> No entanto, a resistência a outros antimicrobianos não foi avaliada por não ser o objetivo desse estudo.

O teste mCIM eCIM é um método fenotípico desenvolvido para detectar e classificar as carbapenemases entre metalo-beta-lactamases e as do tipo serino (KPC, OXA, dentre outras), baseado na inibição da atividade da enzima pelo agente quelante EDTA (Ácido etilendiamino tetra-acético). No Setor de Microbiologia do HJK, após a triagem por meio de metodologia de disco difusão, as cepas com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos foram testadas pelo método. Nesse trabalho, observou-se uma boa concordância entre o método fenotípico e o molecular. Quando foram analisadas as amostras onde houve resultado molecular pela FUNED e o fenotípico (54/128), observou-se a concordância entre 47/54. Entre essas cepas foram 4/54 resultados indeterminados, 1/54 negativo pelo método fenotípico e 2/54 discordantes. Assim, o método mCIM eCIM mostrou-se útil na triagem da produção de carbapenemases, além de possibilitar a classificação rápida do tipo, com a liberação do resultado em 24 horas. Esse dado é importante para orientar a terapia antimicrobiana, uma vez que o composto ceftazidime-avibactam, recém introduzido na instituição, é uma potente opção terapêutica no tratamento de infecções por KPC.<sup>(13)</sup>

Entre as espécies incluídas no estudo e que não apresentam resistência intrínseca, foram encontrados 22/99 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a polimixina, sendo que 15/22 eram KPC e 7/22 NDM. Estudos recentes alertam para o aumento significativo da resistência à polimixina em Enterobacterales produtoras de carbapenemases, sugerindo uma forte associação entre a presença de carbapenemases e a diminuição da atividade da polimixina.<sup>(2)</sup> As cepas que apresentaram resistência foram enviadas para o laboratório de referência da FUNED para pesquisa do gene mcr-1 (*mobilised colistin resistance*) e todos os isolados foram negativos, mostrando que a resistência está relacionada provavelmente a genes cromossomais.

## CONCLUSÃO

Com a escassez de dados locais torna-se difícil prever o impacto que essa pandemia pode causar no aumento da disseminação de microrganismos resistentes. Assim, é importante descrever a emergência de Enterobacterales produtoras de metalo-beta-lactamases em um Hospital de Referência para covid-19. Além disso, o teste fenotípico mCIM eCIM mostrou-se uma boa ferramenta na triagem da produção e na classificação das carbapenemases na instituição.

## AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do Setor de Microbiologia/HJK pelo suporte na condução desse estudo.

## REFERÊNCIAS

1. Vivas R, Dolabella SS, Barbosa AT, Jain S. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53:e20200064.
2. Zhang Z, Guo H, Li X, et al. Genetic Diversity and Characteristics of bla<sub>NDM-1</sub>-Positive Plasmids in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2021;12:729952. Published 2021 Nov 16. doi:10.3389/fmicb.2021.729952
3. Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, Lopes ACS. Association of bla<sub>NDM-1</sub> with bla<sub>KPC-2</sub> and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Res.* 2020; 21:255-261.
4. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA N°01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Brasília (DF);2013.
5. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA N°01/2021. Identificação de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, produtoras de KPC e NDM. Brasília (DF);2021.
6. Viegas DM, Soares VM. Prevalence of carbapenemase in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems isolated in a tertiary referral hospital. *J Bras Patol Med Lab.* 2018;54(2):95-98.

7. Tshisevhe VS, Lekalakala MR, Tshuma N, Janse van Rensburg S, Mbelle N. Outbreak of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri* in a tertiary hospital. *S Afr Med J*. 2016; 107(1):31-33.
8. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-Ed31:2021.
9. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica GVIMS/ GGTES/ANVISA N°05/2021. Orientações para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde no contexto da pandemia da covid-19. Brasília (DF);2021.
10. Dumitru IM, Dumitrascu M, Vlad ND, Cernat RC, Ilie-Serban C, Hangan A, Slujitoru RE, Gherghina A, Mitroi-Maxim C, Curtali L, Carp DS, Dumitrescu A, Mitan R, Lesanu R, Rugina S. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Associated with COVID-19. *Antibiotics*. 2021; 10(5):103390.
11. Arteaga-Livias, K., Pinzas-Acosta, K., Perez-Abad, L., Panduro-Correa, V., Rabaan, A., Pecho-Silva, S., & Dámaso-Mata, B. A multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a Peruvian hospital: Another threat from the COVID-19 pandemic. *Infection Control & Hospital Epidemiol*. 2022; 43(2):267-268.
12. Gao H, Liu Y, Wang R, Wang Q, Jin L, Wang H. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings. *EBioMedicine*. 2020;51:102599.
13. Lopes E, Saavedra MJ, Costa E, de Lencastre H, Poirel L, Aires-de-Sousa M. Epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in northern Portugal: predominance of KPC-2 and OXA-48. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;22:349–53.