

Importância Clínica e Epidemiológica na Detecção Rápida de Bactérias Produtoras de Carbapenemase

Clinical and epidemiological importance in Rapid Detection of bacteria producing carbapenemase

Pedro F. Del Peloso¹, Cassiana da Costa Ferreira Leite¹, Rosemary Nogueira David¹,
Helio Magarinos Torres Filho¹.

¹Laboratório Richet, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

RESUMO

Justificativa e objetivo: A detecção rápida da produção de carbapenemase no laboratório de microbiologia ainda é um desafio, os protocolos disponíveis são preconizados ou desenvolvidos para uso “in house”, o que obriga ao laboratório adquirir todos os reagentes envolvidos na produção e realização do teste. Nosso objetivo foi avaliar o desempenho do teste rápido comercial RAPIDEC® CARBA NP TEST (Biomerieux) na detecção rápida da produção de carbapenemase frente as *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii*. **Métodos:** Os seguintes genes foram pesquisados por metodologia de PCR-RT: KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48. Foram testadas 36 amostras de bactérias que demonstravam resistência a algum dos carbapenems: Ertapenem e/ou Imipenem e/ou Meropenem. Os isolados foram obtidos de amostras clínicas de origem infecciosa ou de swabs de vigilância para bactérias resistentes aos carbapenems (ERC), e seguiram a seguinte distribuição: *Escherichia coli* (3), *Klebsiella pneumoniae* (18), *Klebsiella oxytoca* (1), *Serratia marcescens* (1), *Enterobacter asburiae* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Enterobacter aerogenes* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Providencia rettgeri* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1) e *Acinetobacter baumannii* (7). **Resultados e Conclusão:** Das 36 amostras, 27 foram positivas na detecção genotípica de genes para carbapenemase e 9 foram negativas, na detecção fenotípica da produção de carbapenemase pelo RAPIDEC® CARBA NP TEST, 27 foram positivas e 9 foram negativas, demonstrando 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

DESCRITORES: Carbapenêmicos, Beta Lactamases, Enterobactérias, Antibióticos

ABSTRACT

Background and objectives: Rapid detection of carbapenemase in the clinical microbiology laboratory is still a challenge due to the lack of a gold standard method. Our objective was to evaluate the commercial rapid test RAPIDEC® CARBA NP TEST (BioMérieux) for rapid detection of carbapenemase producers such as *Enterobacteriaceae* species and *Acinetobacter baumannii* isolates, obtained from surveillance cultures and clinical samples. **Methods:** The following genes were detected by PCR-RT methodology: KPC, NDM, VIM, IMP and OXA 48 and bacterial samples showed phenotypical resistance to Ertapenem and/or Imipenem and/or Meropenem (*Escherichia coli* (n=3), *Klebsiella pneumoniae* (n=18), *Klebsiella oxytoca* (n=1), *Serratia marcescens* (n=1), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *Citrobacter freundii* (n=1), *Providencia rettgeri* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=1) e *Acinetobacter baumannii* (n=7). **Results and**

Conclusion: Among the 36 bacterial samples tested, 27 were genotypically positive for carbapenemase genes and 9 were negative, while 27 were phenotypically detected as carbapenemase producers by the RAPIDEC® CARBA NP TEST and 9 were negative. The RAPIDEC® CARBA NP TEST showed 100% of sensitivity and 100% of specificity.

KEYWORDS: Carbapenem, Enterobacteria, Antibiotics

INTRODUÇÃO

As carbapenemases são betalactamases com capacidade para inativar a maioria dos betalactâmicos existentes.¹ A sua propagação entre os bacilos Gram negativos constitui uma grande preocupação de saúde pública devido à sua ampla resistência aos antimicrobianos e a sua rápida disseminação global.^{2,3} A aquisição de uma infecção por uma bactéria produtora de carbapenemase representa um importante fator de risco de mortalidade.⁴ Por estes motivos, a sua rápida detecção é um grande desafio do laboratório de microbiologia clínica sendo de grande importância para a determinação de esquemas antimicrobianos apropriados e de ações de medidas de controle de infecção em unidades de cuidados intensivos.⁵ Neste contexto, os microrganismos produtores de carbapenemase são de extrema importância pela característica de inativar os principais carbapenems disponíveis na prática clínica. Infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemase, na maioria das vezes estão associadas a outros mecanismos de resistência como, por exemplo, betalactamases de amplo espectro (ESBL) e por essa razão muitas vezes as opções terapêuticas são limitadas a poucos e específicos antibióticos.⁶ Três grandes classes de carbapenemases são encontradas atualmente em Enterobactéria no mundo inteiro: as metallo-betalactamase, sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentemente detectadas em Enterobactéria; as OXA-carbapenemases, sendo a mais frequente em Enterobactéria a OXA-48; e as carbapenemases do tipo KPC.^{6,7} Do ponto de vista epidemiológico são de relevância as carbapenemases do tipo KPC e as do tipo NDM, pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial após suas descrições iniciais.⁸ Desde a descrição inicial de KPC no Brasil, várias publicações têm demonstrado a sua disseminação em todo o Brasil, e sua presença em diversos gêneros e espécies bacterianas, inclusive bacilos Gram-negativos não fermentadores.⁹ A disseminação de Enterobactéria produtoras de KPC é um grave problema clínico e epidemiológico.^{10,11} A NDM foi identificada pela primeira vez em 2008 e desde então tem sido amplamente descrita em Enterobactéria causando infecções esporádicas e surtos principalmente na Índia. Casos de *Klebsiella pneumoniae*,

Escherichia coli e *Providencia rettgeri* produtoras de NDM já foram descritos na América Latina, inclusive no Brasil.¹²

Ao realizar um teste de susceptibilidade, o laboratório deverá testar simultaneamente ertapenem, imipenem e meropenem. Caso seja utilizado sistema de automação com painel sem ertapenem este antimicrobiano deverá ser testado por disco-difusão para auxiliar na liberação dos resultados. Caso o isolado seja sensível aos três carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem), o resultado poderá ser liberado como tal, quanto a esse grupo de antimicrobianos, sem testes adicionais, ou seja, não é necessário pesquisar carbapenemases. Para triagem de produtores de carbapenemase em isolados do Grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) deverão ser considerados apenas os resultados de imipenem e meropenem, enquanto para isolados não pertencentes ao Grupo CESP o ertapenem também deverá ser utilizado.

MÉTODOS

Durante janeiro a julho de 2015, foram coletadas aproximadamente 500 amostras de origem infecciosa como também swabs de vigilância que seguiram o seguinte critério de inclusão no estudo: Demonstrar resistência ao Ertapenem. Como critério de rastreamento para Enterobactéria produtoras de carbapenemase, o Ertapenem demonstra a maior sensibilidade, porém outros mecanismos de resistência podem inativar o Ertapenem além da produção de carbapenemase. Para os swabs de vigilância utilizamos o meio cromogênico CHROMagar ESBL® (Plastlabor) utilizado para rastreamento de bactérias suspeitas de produção de ESBL. Este meio fornece a identificação cromogênica presuntiva da bactéria e permite o crescimento de bactérias resistentes as cefalosporina de 3ª geração, sugerindo produção de ESBL ou outro mecanismo de resistência associado. Nas amostras clínicas, após o diagnóstico da etiologia da infecção, realizávamos o teste de sensibilidade em equipamento automatizado Microscan WalkAway® 96 SI – Beckman Coulter utilizando o painel somente de susceptibilidade Neg MIC PanelType 44 onde avaliávamos o padrão de resistência aos carbapenems testados: Ertapenem, Imipenem e Meropenem com as respectivas concentrações: 0.5 a 1.0, 1.0 a 8.0 e 1.0 a 8.0 µg/ml. Todas as identificações de gênero e espécie foram realizadas em equipamento de espectrometria de massa Bruker Daltonics Microflex® juntamente com os softwares Maldi Biotyper® V3.1 e FlexControl V3.3. Todos os resultados de resistência intermediária ou plena a

Imipenem ou Meropenem encontrados no Microscan, foram confirmados pela metodologia de disco difusão Kirby e Bauer seguindo a padronização e interpretação do documento Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement (M100-S25).

Utilizamos o teste RAPIDEC® CARBA NP TEST (Biomerieux) para a detecção rápida de produção de carbapenemase em *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii*. O teste consiste em uma tira plástica pronta para uso, e baseia-se na detecção da hidrólise do carbapenems por bactérias produtoras de carbapenemase. A hidrólise acidifica o meio resultando na mudança de cor do indicador de pH. Após a lise bacteriana que permite a extração da enzima, o lisado é adicionado a uma solução de detecção que contém Imipenem (substrato de carbapenemase), vermelho de fenol (indicador de pH) e zinco (necessário para a detecção de cepas produtoras de metallo-beta-lactamase). Após a incubação de um período máximo de duas horas, a leitura é realizada visualmente através da comparação de um poço controle sem Imipenem com um poço de reação contendo Imipenem. As amostras dos microrganismos testados foram isoladas de meios de cultura como: Agar Sangue de Carneiro, Agar Mueller Hinton, Agar Cled ou Agar Cromogênico seletivo. Foram selecionadas amostras com 24 a 48 horas de incubação, o procedimento de preparação da tira, preparo da lise bacteriana, do inóculo e da leitura e interpretação, foram realizados seguindo as orientações contidas na bula do produto.

RESULTADOS

Das 36 amostras genotipadas para os genes: KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48, 27 foram positivas (Tabela 1), essas amostras também foram submetidas à detecção fenotípica rápida de carbapenemase pelo teste RAPIDEC® CARBA NP TEST e todas mostraram resultados positivos. Das 9 amostras que foram negativas pela genotipagem, 7 eram amostras de *Acinetobacter baumannii*, uma *Klebsiella pneumoniae* e um *Enterobacter asburiae*. Todas foram negativas no teste de detecção rápida de carbapenemase pelo RAPIDEC® CARBA NP TEST.

Tabela 1 - Prevalência dos genes de carbapenemase por espécie bacteriana.

| | KPC | NDM | VIM | IMP | OXA-48 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. cloacae</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | |
|-------------------------------|----|---|---|---|---|
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 15 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Providencia rettgeri</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

No caso dos *Acinetobacter baumannii*, atribuímos esses fenótipos de resistência aos carbapenems provavelmente pela presença de produção de cefalosporinase, alteração de porina ou outros genes produtores de carbapenemases não pesquisados neste trabalho (OXA-23, 58, 72, 23, etc.). O fenótipo de resistência aos carbapenems na *Klebsiella pneumoniae* e no *Enterobacter asburiae*, podem estar relacionados provavelmente a hiperexpressão de AmpC e ou ESBL, alteração de porina ou presença de gene não pesquisado neste trabalho.

Todos os isolados mostraram resistência a um dos carbapenems testados: Ertapenem, Imipenem e Meropenem. A resistência ao Ertapenem estava presente em 100% das amostras, contudo, encontramos três amostras com sensibilidade ao imipenem ou meropenem (Tabela 2). Realizamos também a detecção fenotípica de produção de ESBL (Beta lactamase de amplo espectro) para as bactérias preconizadas pelo CLSI onde os isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* mostraram 100% de positividade.

Tabela 2: Concentração inibitória mínima dos carbapenems avaliados

| Microrganismo | Ertapenem | Imipenem | Meropenem |
|--------------------------------|-----------|----------|-----------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>A. baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>A. baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>A. baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>A. baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |

| | | | |
|-------------------------------|----|-----|-----|
| <i>A. baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>A. baumannii</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | >1 | 2 | 4 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>E. asburiae</i> | >1 | 2 | >8 |
| <i>E. cloacae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>Escherichia coli</i> | >1 | 2 | 2 |
| <i>E. coli</i> | >1 | 2 | 2 |
| <i>E. coli</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | >1 | 2 | <=1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 2 | <=1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 2 | 2 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 4 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 2 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | <=1 | 4 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 8 | 8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 4 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | 2 | 8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>Providencia rettgeri</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | >1 | >8 | >8 |
| <i>Serratia marcescens</i> | >1 | 4 | 4 |

DISCUSSÃO

A detecção rápida da produção de carbapenemase no laboratório de microbiologia ainda é um desafio.¹³ Os protocolos disponíveis tanto pelo CLSI (Carba NP e Teste de Hodge Modificado), EUCAST (Discos Combinados e Carba NP) ou ANVISA (Discos Combinados), são preconizados e desenvolvidos para uso “in house”, o que obriga ao laboratório adquirir todos os reagentes envolvidos na produção e realização do teste, além disso, todo o controle de qualidade interno do teste também

tem que ser desenvolvido com a aquisição de cepas controles com todos os genes a serem testados, controle de lote da fabricação dos testes, controles negativos, controle de qualidade dos meios de cultura (Disco Combinados) e documentação de registro de desempenho de todos os testes produzidos. Com exceção do teste rápido Carba NP, os testes de Hodge Modificado e de Discos Combinados, eventualmente necessitam de repiques com 24 horas de crescimento do microrganismo para a obtenção de colônias puras e novas assim como o repique dos controles positivos para a realização do teste, além de mais 24 horas adicionais para o resultado final após incubação. Para laboratórios de médio e grande porte que atendem a Unidades Hospitalares onde rotinas de rastreamento de vigilância para bactérias resistentes aos carbapenems e produção de carbapenemase são realizadas continuamente, desenvolver e implantar metodologias “in house” adicionam um impacto relevante do ponto de vista operacional e interpretativo. Portanto, o desenvolvimento de testes comerciais rápidos para a detecção de carbapenemase é fundamental para trazer agilidade no diagnóstico com especificidade e sensibilidade, já que por ser produzido comercialmente, não só o desempenho como os prazos de validade, controles de qualidade e produção dos reagentes, são garantidos por processos validados pelo fabricante.

É preciso também saber a diferença entre uma *Enterobacteriaceae* ERC (Enterobactéria resistente aos carbapenems) de uma Enterobactéria produtora de carbapenemase, em ambos os casos vai existir a necessidade de isolamento de contato do paciente portador, porém, se o isolado for de uma amostra clínica, precisamos saber se há produção de carbapenemase ou se a resistência aos carbapenems é por outros mecanismos. Nos isolados que demonstram resistência aos carbapenems com produção de carbapenemase confirmada por testes rápidos fenotípicos ou por testes moleculares, mas que eventualmente mostraram sensibilidade a imipenem ou meropenem, a determinação da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo ou por Etest® pode ser de grande auxílio na terapia antimicrobiana desses pacientes, sempre levando em consideração que há produção de enzima e que dependendo do sítio da infecção, isso tem que ser considerado como um fator complicador.^{13,14}

Os protocolos do CLSI e do EUCAST, apenas preconizam a detecção de bactérias produtoras de carbapenemase para fins epidemiológicos, já que após a revisão dos pontos de corte para os carbapenems, não haveria razão para detectar a produção de carbapenemases em bactérias que demonstrassem sensibilidade aos carbapenems “in vitro”. Um dos problemas dessa recomendação é a necessidade do laboratório de

microbiologia de rastrear pacientes portadores de bactérias resistentes aos carbapenems, seja de um isolado produtor de carbapenemase mediada por gene específico ou isolados resistentes por outros mecanismos. A outra questão mais importante, é que eventualmente isolados produtores de carbapenemase mediadas por genes específicos, tem concentrações inibitórias mínimas abaixo do ponto de corte demonstrando sensibilidade “in vitro”, mas estão produzindo enzimas que hidrolisam os carbapenems. Sabemos que a determinação da concentração inibitória mínima de um antibiótico em um teste de susceptibilidade, é apenas uma das informações que vão dar início a uma terapia antimicrobiana. Pontos de corte variam por tipo de infecção (cistite, sepse ou meningite), pontos de corte variam em função do método de administração (IV, IM ou oral), somente o ponto de corte, não prediz sozinho sensibilidade ou resistência a um antibiótico para todos os pacientes, em qualquer sitio de infecção, sob qualquer condição e finalmente os pontos de corte são para níveis de antibiótico atingido no sangue (e outras infecções?).

Quando um isolado resistente aos carbapenems é detectado no laboratório de microbiologia em uma amostra clínica pelo teste de susceptibilidade, a implantação das metodologias para a detecção fenotípica ou genotípica dessas carbapenemases será determinada pelo custo, pelo tempo disponível para o trabalho e pelas habilidades técnicas do laboratório.

REFERÊNCIAS

1. Ben-David D, Maor Y, Keller N, et al. Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect. Control and Hosp. Epidemiol* 2010; 31 (5): 620-626.
2. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types using a biochemical test in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas*. *Antimicrobial Agents Chemother* 2012; 56 (12): 6437-6440.

3. Fournier S, Lepointeur M, Kassis-Chikhani N, et al, AP-HP Outbreaks Control Group. Link between carbapenemase-producing Enterobacteria carriage and crossborder exchanges: eight-year surveillance in a large French multihospitals institution. *J Travel Med* 2012; 19 (5):320–323.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1708-8305.2012.00641.x>
4. Kuenzli E, Jaeger VK, Frei R, et al. High colonization rates of extended-spectrum -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Swiss travellers to South Asia—a prospective observational multicentre cohort study looking at epidemiology, microbiology and risk factors. *BMC Infect Dis* 2014; 14:528.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-528>
5. Lee SY, Kotapati S, Kuti JL, et al. Impact of extended-spectrum betalactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species on clinical outcomes and hospital costs: a matched cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:1226–1232. <https://doi.org/10.1086/507962>
6. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(9): 785–796. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
7. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, et al. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37 (5):939–946. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.37.5.939>
8. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, et al. Does broadspectrum -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (4): 689–692. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq520>
9. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases* 2012; 18 (9): 1503-1507.
10. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; (Vol 42 no 1): 53–58.
11. Rottier WC, Ammerlaan HSM, Bonten MJM. 2 Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum -lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67 (6): 1311–1320.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks065>
12. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navonvenezia S, et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized

adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial Agents Chemother* 2008; 52 (3): 1028-1033.

13. World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2014
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua1
14. Yoshikawa TT. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *J Am Geriatr Soc* 50 (s7): 226–229.
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1532-5415.50.7s.2.x>

AHEAD OF PRINT